

Anwendungsmöglichkeiten der Hochdruckflüssigchromatographie in der pharmazeutischen Analytik

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Friedrich-Wilhelm Tank

aus Isernhagen

Marburg/Lahn 1976

Anwendungsmöglichkeiten der Hochdruckflüssigchromatographie in der pharmazeutischen Analytik

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

**Erlangung der Doktorwürde
des**

**Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**



**vorgelegt von
Friedrich-Wilhelm Tank
aus Isernhagen**

Marburg/Lahn 1976



Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 2. 12. 1976
Tag der mündlichen Prüfung: 10. u. 15. 12. 1976
Berichterstatter: Prof. Dr. S. Ebel
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Klamberg

Die vorliegende Arbeit entstand an dem von
Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Horst Böhme
und Herrn Professor Dr. Klaus Hartke gelei-
teten Institut für Pharmazeutische Chemie
und Lebensmittelchemie der Philipps-Univer-
sität Marburg/Lahn auf Anregung und unter
Anleitung von

Herrn Professor Dr. Siegfried Ebel.

Für alle Hilfe, jegliche Unterstützung und
die äußerst fruchtbare Zusammenarbeit im
Arbeitskreis möchte ich mich an dieser
Stelle sehr herzlich bedanken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Aufbau eines Flüssigchromatographen	7
3. Meßanordnung	11
4. Retentionszeiten von Substanzen	12
4.1. an einer Adsorptionssäule	18
4.2. an einer Reverse-Phase Säule	27
4.3. in Abhängigkeit von	37
4.3.1. Polarität	37
4.3.2. Strömungsgeschwindigkeit	39
4.3.3. Temperatur	41
5. Qualitative Trennungen von Pyrazolonen, analgetischen Anilinderivaten, Purinen, Sulfonamiddiuretika, hypnotischen Ureiden, Nitroheteroaromaten, PHB-Estern, Barbitur- säuren und hypnotischen Amiden, substi- tuierten Benzoesäurederivaten	43
6. Analysenauswertung und Berechnung	49
6.1. Auswerteverfahren	49
6.2. Quantitative Bestimmungsmethoden	50
6.2.1. Externer Standard	50
6.2.2. Zumischmethode	51
6.2.3. Interner Standard	51
6.3. Bestimmung des Standardkorrekturfaktors	52
6.4. Berechnung nach Nalimov	54

7.	Quantitative Adsorptionschromatographie von	57
7.1.	Salicylamid	58
7.2.	Phenylbutazon	60
7.3.	Acetylsalicylsäure und Acetophenetidin	61
7.4.	Phenylbutazon und Propyphenazon	62
7.5.	Salicylamid, Acetophenetidin und Coffein	63
7.6.	Acetylsalicylsäure, Acetophenetidin und Coffein	64
7.7.	Vergleich der Auswerteverfahren	68
7.8.	Acetylsalicylsäure und Coffein im Verhältnis 10:1	69
7.9.	Cafaspin [®] Tabletten	70
7.9.1.	Vergleich quant. HPLC - DC	71
7.10.	Neuralgin [®] Tabletten	72
7.11.	Melabon Kopfschmerztabletten [®]	75
8.	Quantitative Reverse-Phase Chromatographie von	76
8.1.	Paracetamol und Phenylbutazon	76
8.2.	Citronensäure, Coffein und Phenazon	77
8.3.	Coffein, Acetophenetidin und Aminophenazon	78
8.4.	Coffein, Phenazon, Lactophenin und Aceto- phenetidin	79
8.5.	Metamizol und Aminophenazon	80
8.6.	Coffein, Acetophenetidin und Salicylamid	81
8.7.	Acetylsalicylsäure, Paracetamol und Coffein	83
8.8.	Coffein, Phenazon, Acetophenetidin und Aminophenazon	85

9.	Bestimmung der Reproduzierbarkeit im Nanogrammbereich	87
9.1.	Bestimmung der spezifischen Extinktion von Danthron	88
10.	Schlußbetrachtung	89
	Zeichenerklärung	90
	Literaturverzeichnis	91

1. Einleitung

High performance liquid chromatography (HPLC), high pressure liquid chromatography (HPLC), high speed liquid chromatography (HSLC) oder liquid chromatography (LC) ¹⁻⁸⁾ sind Bezeichnungen für eine verbesserte Säulenchromatographie, die durch Anwendung von Überdruck (30-160 atü) ⁹⁻¹¹⁾ bei stark vergrößerter Oberfläche der stationären Phase zu sehr schneller und scharfer Auftrennung von Substanzgemischen unter besonders milden Umständen führt. Die einzige Bedingung dieser Mikromethode ist die Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in der mobilen Phase. Da sowohl thermische Labilität oder hohes Molekulargewicht einer Substanz kein Hindernis mehr bilden, als auch Derivatisierungen ¹²⁾ meistens entfallen, führte sie zu einem großen Anwendungsgebiet ¹³⁾:

Aflatoxine ¹⁴⁻¹⁶⁾	Fettsäuren ^{73,74)}
Alkaloide ¹⁷⁻²³⁾	Glyceride ⁷⁵⁻⁷⁷⁾
Alkohole, Äther ²⁴⁻²⁶⁾	Glykoside ^{78,79)}
Amine, Amide ²⁷⁻⁴¹⁾	heterocyclische N-Verbindungen ⁸⁰⁻⁸²⁾
Aminosäuren ⁴²⁻⁴⁶⁾	
Anaesthetika ⁴⁷⁾	Herbizide ^{83,84)}
Antibiotika ⁴⁸⁻⁵⁵⁾	Insektizide ⁸⁵⁻⁹⁰⁾
Barbiturate ⁵⁶⁾	Isomere ^{91,92)}
Carbonsäuren ⁵⁷⁻⁶⁵⁾	Katecholamine ^{93,94)}
Chlorophyll ⁶⁶⁾	Kationen ⁹⁵⁻⁹⁸⁾
Sprengmittel, Explosivstoffe ⁶⁷⁻⁶⁸⁾	Keto-, Hydroxisäuren ⁹⁹⁻¹⁰³⁾
Fette ⁶⁹⁻⁷²⁾	Kohlenhydrate ¹⁰⁴⁻¹¹⁰⁾

Kohlenwasserstoffe, aliphatische 111,112)	Pflanzeninhaltsstoffe 164-168)
Kohlenwasserstoffe, aromatische 113-127)	Pflanzenwuchsstoffe 169)
Konservierungsstoffe 128-130)	Pharmazeutische Produkte 170-182)
Kunststoffe 131,132)	
Lipide 133-135)	Phenole 183-187)
Metallorganische Verbindungen 136-138)	Sedativa 188)
Nucleoside, Nucleotide, Purine 139-154)	Sterine 189)
Öle, ätherische 155)	Steroide 190-204)
Peptide, Proteine 156,157)	Stickstoffverbindungen 205)
Peroxide 158)	Stoffwechselprodukte 206,207)
Pestizide 159-163)	Vitamine 208-215

Während mit der Gaschromatographie etwa ein Sechstel aller bekannten chemischen Verbindungen voneinander getrennt werden können, ist der Anteil bei der HPLC mindestens viermal größer. Man sagt, daß gerade solche Substanzen mit der Flüssigchromatographie, die Adsorptions- 216), Verteilungs- 217), Ionenaustausch- 218,219) und Gelchromatographie 220-222) umfaßt, getrennt werden können, die mit der GC nur schwierig oder gar nicht zu analysieren sind. Es kann sowohl analytisch 223) und präparativ 224-234) gearbeitet als auch Drogen- und Metabolitenforschung 235-248) betrieben werden.

Geeignete Trennmaterialien 249-264) für die HPLC sind z.B. bei der Adsorption: Perisorb, Nucleosil, Zipax, Pellumina,

Pellidon, SIL X II, Merkosorb, Porasil, Silica Woelm, Zorbax SIL, SIL X I und bei der Reverse-phase Chromatographie: Vydac 201 RP, Permaphase ODS, Perisorb RP, ODS SIL X I, Zorbax ODS. In dieser Arbeit wurden die Kieselgele SIL X I, SIL X II, ODS SIL X (Hersteller: Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen) und ein C_8 -Reverse-phase Material, $8\text{ }\mu\text{m}$, der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. SIL X I ist ein poröses Kieselgel mit unregelmäßiger Kornform, einer mittleren Korngröße von $8\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$ und einer Oberfläche von $300\text{ m}^2/\text{g}$; SIL X II besteht aus einem inerten Glaskern von etwa $30\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser, der zwecks kürzerer Diffusionswege mit einer etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ dünnen Kieselgelschicht belegt ist. Die Oberfläche beträgt $12\text{ m}^2/\text{g}$. Diese werden als Festschichtkügelchen oder porous layer beads (PLB) bezeichnet.

Auf Kieselgel lassen sich polare bis mittelpolare Substanzen trennen. Als Eluenten verwendet man unpolare Lösungsmittel wie n-Hexan, Chloroform, THF oder Dioxan. Für starke Säuren und Basen empfiehlt sich die Ionenaustausch-, für Substanzen mit hohem Molekulargewicht die Gelchromatographie.

Um die Retentionszeit von polaren Substanzen zu verkürzen oder unpolare, aromatische Kohlenwasserstoffe zu trennen, bedient man sich der "Reverse-Phase" Chromatographie, bei der die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar ist. Die Säulenfüllung besteht aus unpolaren, aliphatischen Kohlenwasserstoffketten (meist C-18), die kovalent an das Silizium des Kieselgels gebunden sind. Als mobile Phase verwendet man Methanol/Wasser, bzw. Acetonitril/Wasser Gemische.

Acetonitril hat gegenüber Methanol den Vorteil, daß die Viskosität nur halb so groß ist. Es können dadurch entweder der hohe Eingangsdruck herabgesetzt oder die Strömungsgeschwindigkeit erhöht werden. Ein Nachteil ist der hohe Preis und die Vergiftungsgefahr beim Einatmen oder bei Resorption durch die Haut. Es sollte daher möglichst mit Methanol und nur in speziellen Fällen mit Acetonitril gearbeitet werden.

Die Güte der Trennung richtet sich nach der Anzahl der theoretischen Trennböden, d.h. bei vorgegebener Säulenlänge nach der Trennbodenhöhe. Je kleiner die Höhe der theoretischen Böden, desto größer ist deren Anzahl, und desto besser ist die Trennleistung.

Die Höhe des theoretischen Bodens (H) ist abhängig vom Füllmaterial und der Durchflußgeschwindigkeit (U). Die H/U Kurve gibt die Abhängigkeit der Bodenhöhe von der Durchflußgeschwindigkeit für verschiedene Sorbentien an.

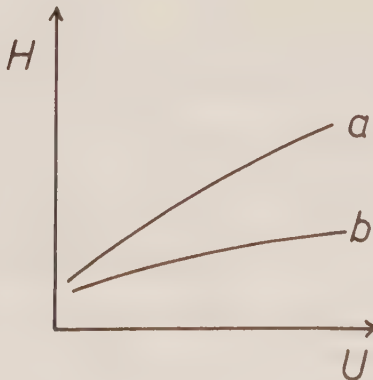


Abb. 1 : H/U Kurve für SIL X I (a) und SIL X II (b)

Aus der graphischen Darstellung ergibt sich, daß bei SIL X II die Durchflußrate ohne wesentlichen Verlust an Bodenhöhe erhöht werden kann, d.h. die Analysendauer kann verkürzt werden.

Die genaue Abhängigkeit der Bodenhöhe von den verschiedenen Parametern der Auftrennung gibt die "van-Deemter-Gleichung":

$$H = A + \frac{B \cdot D_m}{U} + C \cdot \left(\frac{I_m^2}{D_m} + \frac{I_s^2}{D_s} \right) \cdot U$$

H = Bodenhöhe

A = Term der Streudiffusion, der bestimmt wird durch die Partikelgröße und die Packungsunregelmäßigkeiten. Er ist unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit und bei gut klassifizierten, kleinen Sorbenspartikeln sehr klein.

U = Strömungsgeschwindigkeit

B = Term für die Längsdiffusion (D_m/U). Er ist bei Strömungsgeschwindigkeiten größer als 0,5 cm/sec wegen der niedrigen Diffusionskoeffizienten (in Flüssigkeiten 10^{-5} cm²/sec, in Gasen 10^{-1} cm²/sec) zu vernachlässigen.

D_m = Diffusionskoeffizient in der mobilen Phase

D_s = Diffusionskoeffizient in der stationären Phase

I_m = Diffusionsweg in der mobilen Phase

I_s = Diffusionsweg in der stationären Phase

C = Es tritt sowohl eine Längs- als auch eine Querdiffusion auf, wobei letztere bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten überwiegt. Jene ist abhängig vom Diffusionskoeffizienten D_m und vom Teilchendurchmesser (d_p^2), denn wenn der Abstand zwischen den Partikeln kleiner wird, so verringern sich auch die Diffusionswege. Die Diffusionskoeffizienten kann man in ihrer Größe kaum beeinflussen. Als einzige Möglichkeit zur Verringerung des C-Terms kann man die Diffusionswege I_m und I_s in der mobilen und stationären Phase so klein wie möglich machen. Dies erreicht man sowohl durch Säulenfüllungen mit sehr kleiner Partikelgröße, als auch mit speziellem Aufbau, wie z.B. SIL X II.

Bei abnehmender Partikelgröße wird es schwierig, eine homogene Anordnung zu erreichen. Es sinkt die Permeabilität der Packung und der aufzuwendende Pumpendruck steigt stark an, so daß der untere Partikeldurchmesser bei annähernd 5 μm liegt.

2. Aufbau eines Hochdruck-Flüssigchromatographen

Ein Hochdruck-Flüssigchromatograph ²⁶⁵⁻²⁷¹⁾ besteht prinzipiell aus folgenden Teilen: Vorratsgefäß für das Elutionsmittel, Pumpe, Probenaufgabemöglichkeit, Säule, Detektor.

Um das Elutionsmittel aus dem Vorrat durch die Säule zu pumpen, kann man verschiedene Pumpentypen einsetzen. Die Langhubkolbenpumpen fördern pulsationsfrei unabhängig vom Gegendruck und der Viskosität des Lösungsmittels, so daß eine Dämpfungseinrichtung entfällt. Dichtungsprobleme treten wegen des großen Kolbenquerschnitts auf. Bei Kurzhubkolbenpumpen gibt es diese Schwierigkeiten nicht. Sie fördern allerdings nicht pulsationsfrei, so daß ein Dämpfungsglied notwendig ist. Ebenfalls eingesetzt werden Membranpumpen, die zwar preislich recht günstig sind, aber auch nicht pulsationsfrei arbeiten. Außerdem ist die Förderleistung stark vom Gegendruck abhängig.

Der sich von der Säule aufbauende Druck wird von einem Manometer angezeigt. Liegt die Referenzzelle des Detektors im Hochdruckteil, so muß der erlaubte Höchstdruck der Zelle beachtet werden.

Beim Erneuern des Elutionsmittels muß dieses, bei der Reverse-phase Chromatographie besonders das Wasser, möglichst ohne Blasen eingefüllt werden. Falls dies nicht ganz gelingt, so lassen sie sich dann aber mit einem Glasstab von der Innenwandung entfernen, durch Ultraschall, vorheriges Auskochen oder durch ein Entgasen im Vakuum, so daß während eines Chromatogramms keine Luftblasen die Detektorzelle verschließen und zu Störungen führen. Entsprechendes wird erreicht,

wenn mit einem Rückstauventil am Detektorausgang ein Gegen-
druck von 1-2 atü aufgebaut wird. Der normalerweise nach der
Säule eintretende Druckabfall wird verhindert, die Luftblasen
können sich nicht entspannen und zu Störungen führen.

Mit einer 10 µl Hamilton-Spritze wird die Probe durch ein
Septum auf den Säulenanfang gegeben ^{272,273}). Weil bei der
Adsorption die organischen Lösungsmittel leicht Weichmacher
oder andere Bestandteile, die zu "Geisterpeaks" führen, aus
dem Septum herauslösen können, sind diese einseitig mit Teflon
beschichtet. Sie sind täglich zu wechseln. Zeigt das Manome-
ter mehr als 2000 PSI (14,7 PSI = 1 atm), so empfiehlt sich
die Anwendung einer Dosierschleife oder eines "Stop flow"
Ventils.

Die 25 oder 50 cm langen Stahlfertigsäulen befinden sich
in einem aufheizbaren Ofenraum. Bei chemisch gebundenen Phasen
muß die Temperaturgrenze beachtet werden. Der V 4-A Stahl der
Kapillaren wird angegriffen durch Chloride, halogenierte Koh-
lenwasserstoffe und einige organische Säuren wie z.B. Citro-
nensäure. Bei der Reverse-Phase Chromatographie kann deshalb
etwas Phosphorsäure dem Eluenten zugesetzt werden. Bei der
Adsorption darf keine starke Säure zugesetzt werden, da eine
Veresterung mit den freien Silanolgruppen der stationären
Phase eintritt. Dies würde zu einer irreversiblen Verände-
rung des Säulenfüllmaterials führen. Ein schützender Oxy-
dationsfilm auf dem V 4-A Stahl läßt sich durch ein zwischen-
zeitliches Spülen mit 10%iger Salpetersäure aufbauen.

Mit einer Gradientensteuerung²⁷⁴⁻²⁷⁹⁾ kann man die Zusammensetzung des Eluenten während einer Analyse verändern. Hierzu sind zwei elektronisch gesteuerte Pumpen mit jeweils unterschiedlicher Lösungsmittelfüllung notwendig. In einer Mischzelle werden die zwei Flüssigkeitsströme vereint, gemischt und dann zum Säulenanfang geleitet.

Detektionsmöglichkeiten²⁸⁰⁻²⁸⁴⁾ bestehen in der Anwendung eines UV-, RI (Brechungsindex)-²⁸⁵⁾, Fluoreszenz-²⁸⁶⁻²⁸⁹⁾, Flammen-Emissions-²⁹⁰⁾, Hitzdraht-²⁹¹⁾, elektrochemischen^{292,293)} oder kolorimetrischen Detektors²⁹⁴⁾ oder der Kombination mit einem Massenspektrographen^{295,296)}.

In dieser Arbeit wurde der Flüssigchromatograph 1220 der Firma Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen, verwendet. Dieser besteht aus zwei Langhubkolbenpumpen, einer Mischzelle, einem Manometer, einem Septum, der Trennsäule in einem bis zu 200° C aufheizbaren Ofenraum, einem UV-Detektor, einem Programmgeber für die Gradientenelution und einem Rückstauventil.

Die Pumpen fördern mit einer Reproduzierbarkeit von 0,1 %. Die Durchflußrate kann zwischen 0,05 und 6 ml/min betragen. Ein Lösungsmittelwechsel oder ein Nachfüllen des Eluenten ist in kurzer Zeit durch Abschrauben der 500 ml fassenden Vorratsgefäße möglich. Da die beiden Pumpen nicht nur synchron, sondern auch nacheinander schaltbar sind, reicht bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 ml/min der vorgefertigte Lösungsmittelvorrat für gut 15 Stunden.

Die Detektion erfolgte anfangs durch einen Zweistrahlfestwellen-UV-Detektor von 254 nm mit einer Quecksilber-

niederdrucklampe. Später wurde ein Photometer mit variabler Wellenlänge von 195 - 900 nm (LC 55 von Perkin-Elmer) verwendet. Dieses enthielt eine Wolframhalogenlampe für den sichtbaren und für den UV-Bereich eine Deuteriumlampe.

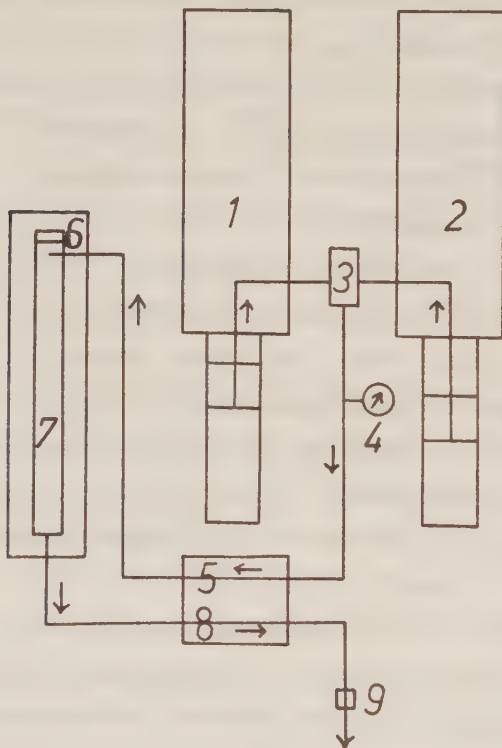


Abb. 2 : Aufbau des Hochdruckflüssig-Chromatographen PE 1220

- | | |
|------------------------|------------------------|
| 1 : Langhubkolbenpumpe | 2 : Langhubkolbenpumpe |
| 3 : Mischzelle | 4 : Manometer |
| 5 : Referenzzelle | 6 : Septum |
| 7 : Säule | 8 : Meßzelle |
| 9 : Rückstauventil | |

3. Meßanordnung

Nach der Auftrennung eines Analysengemisches wird von jeder Substanz die Differenz der UV-Absorption zwischen der Referenz- und der Meßzelle durch zwei Photodioden gemessen und verstärkt auf einen Schreiber oder Integrator gegeben, wobei sich das logarithmische Signal entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz in verdünnten Lösungen linear zur Konzentration verhält. Der Schreiber (Metrohm Labograph E 478) und der Integrator (HP 3370 A) sind parallel geschaltet. Hierdurch erhält man von ein und demselben Detektorsignal sowohl eine elektronisch integrierte Fläche als auch ein Schreiberchromatogramm, die beide direkt miteinander vergleichbar sind.

Nach Abschluß der Analysen werden die erhaltenen Integratorwerte und die von Hand ausgemessenen Peakdaten in einen Rechner (HP 9830 A) gegeben, der über ein Interface mit einer elektrischen Schreibmaschine (Facit) verbunden ist.

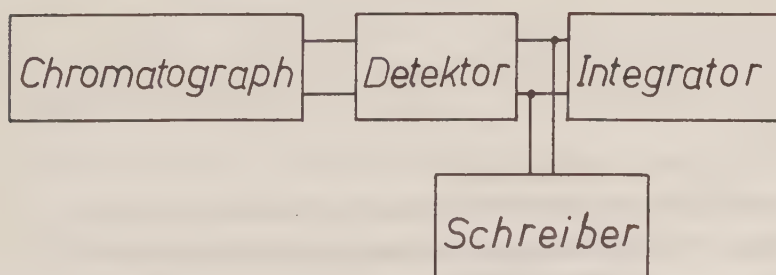


Abb. 3 : Meßanordnung

4. Retentionszeiten von Substanzen

Wichtig für die chromatographische Trennung von Substanzen an oder in der stationären Phase ist eine Retention, die von der Substanz selbst, der stationären Phase, dem Elutionsmittel, der Stömungsgeschwindigkeit und der Temperatur abhängt. Hält man diese Bedingungen konstant, so unterscheiden sich die Substanzen nur in ihrer Aufenthaltszeit in oder an der stationären Phase, d.h. ihre Netto-Retentionszeit ist unterschiedlich. Dies gilt für alle chromatographischen Trennmethoden.

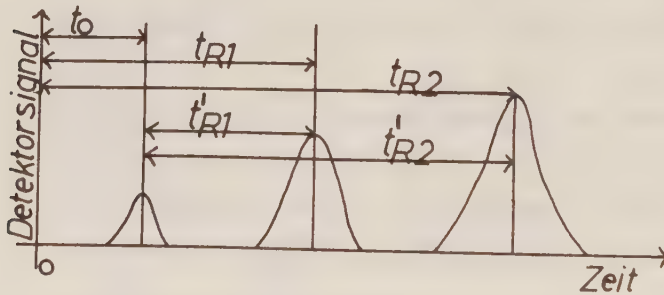


Abb. 4

Totzeit t_0

Die Totzeit ist die Aufenthaltszeit der Substanz in der mobilen Phase. Sie ist für alle Substanzen gleich. Ermittelt wird die Totzeit durch Eingeben eines nicht retardierbaren Stoffes auf die Säule.

t_0 = Zeit von der Eingabe bis zum Maximum des Peaks

Brutto-Retentionszeit t_R

Die Brutto-Retentionszeit ist die Zeit von der Eingabe einer Substanz bis zum maximalen Detektorausschlag. Sie setzt sich zusammen aus der Totzeit und der Netto-Retentionszeit.

Netto-Retentionszeit t'_R

Die Netto-Retentionszeit muß unabhängig von der Probenmenge sein, will man die Chromatographie zur qualitativen Identifizierung von Stoffen verwenden, denn man benötigt symmetrische Bandenformen, die mit einer Gauß-Kurve zu beschreiben sind.

Die Netto-Retentionszeit ist die Aufenthaltszeit der Substanz in oder an der stationären Phase. Sie errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$t'_R = t_R - t_0$$

Kapazitätsverhältnis k'

Das Kapazitäts- oder Massenverteilungsverhältnis k' ergibt sich als Quotient der Aufenthaltszeit einer Substanz in der stationären und der mobilen Phase:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Der k' Wert ist unabhängig von der Säulenlänge und der Strömungsgeschwindigkeit.

Relative Retention α

Als relative Retention bezeichnet man den Quotienten zweier Massenverteilungsverhältnisse bei konstanten Bedingungen und gleicher stationärer Phase.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

Die relative Retention ist ein Maß für die Selektivität eines Trennsystems. Je mehr sie von 1 abweicht, desto größer ist die Trennfähigkeit des Systems für die zu untersuchenden Substanzen, d.h. desto stärker hält die stationäre Phase eine der beiden Komponenten fest. Nähert sich die relative Retention dem Wert 1, so können die Komponenten mit diesem System nicht mehr getrennt werden.

Die relative Retention hängt bei konstanter Temperatur nur von der stofflichen Qualität der Proben und den Eigenschaften der mobilen und stationären Phase ab. Die Bestimmung der relativen Retention verschiedener Probenpaare an der gleichen Trennsäule über ihre Benutzungsdauer hinweg ist die einzige Möglichkeit, Veränderungen der Säule festzustellen.

In der quantitativen Analyse wendet man mit sehr gutem Erfolg die Methode des internen Standards an. Hierzu ist es erforderlich, eine weitere Substanz zu der Analysenmischung zu geben. Dies wiederum setzt voraus, daß man eine möglichst große Anzahl von Retentionsdaten zur Hand hat, um den internen Standard in Vorversuchen zu ermitteln, was nicht

immer leicht ist, da man die Retentionszeit einer Substanz nicht ohne weiteres vorhersagen kann. Die Aufstellung einer Substanzreihe mit ansteigenden Retentionszeiten bei unterschiedlicher Polarität der mobilen Phase gibt einen Überblick über einen möglichen Standard, die Identifizierung einer unbekannten Substanz und über durchzuführende Trennoperationen und Optimierungen ²⁹⁷⁻³⁰⁶⁾ bei Analysenproblemen. Hierbei wird ebenfalls die Hildebrandt-Skala ³⁰⁷⁾ verwendet, die die Lösungsmittel nach steigender Polarität geordnet hat. Die angegebenen Retentionszeiten können natürlich nur Anhaltspunkte sein. Es empfiehlt sich daher, immer eine Vergleichsmessung mit der Reinsubstanz durchzuführen. Die Retentionsfähigkeit z.B. einer Adsorptionssäule ist auch davon abhängig, welche polaren Lösungsmittel im Eluenten bei vorhergegangenen Versuchen enthalten waren. Da sich diese teilweise an den freien -SiOH Gruppen festsetzen, dürfte ein teilweiser Übergang von der Adsorptions- zur Verteilungschromatographie stattfinden, was eine Änderung der Retentionszeiten bedingt.

Wenn anhand der Tabelle eine gute Trennung möglich ist, so empfiehlt sich die Anwendung einer Säule mit geringerer Kapazität z.B. von SIL XI auf SIL XII.

Tabelle 1 : Lösungsmittel für die Flüssig-Chromatographie
geordnet nach steigender Polarität
(Hildebrandt-Skala) 307)

Lösungsmittel	Polarität	Viskosität cP (20°)	Brechungs- index n	UV- Grenze nm
Fluoralkane	-0,25	-	1,25	-
N-Pentan	0,00	0,23	1,358	210
Hexan	0,00	-	1,375	210
Isooctan	0,01	-	1,404	210
Petroläther	0,01	0,3	-	210
n-Decan	0,04	0,92	1,412	-
Cyclohexan	0,04	1,00	1,427	210
Cyclopentan	0,05	0,47	1,406	210
Di-isobutylen	0,06	-	1,411	210
1-Penten	0,08	-	1,371	-
Schwefelkohlenstoff	0,15	0,37	1,626	380
Kohlenstofftetrachlorid	0,18	0,97	1,466	265
Amylchlorid	0,26	0,43	1,413	225
Butylchlorid	0,26	-	1,436	220
Xylol	0,26	0,62-0,81	~1,50	290
Isopropyläther	0,28	0,37	1,363	220
Isopropylchlorid	0,29	0,33	1,378	225
Toluol	0,29	0,59	1,496	285
n-Propylchlorid	0,30	0,35	1,389	225
Chlorbenzol	0,30	0,80	1,525	-
Benzol	0,32	0,65	1,501	280
Äthylbromid	0,37	-	1,424	-
Äthyläther	0,38	0,23	1,353	220
Äthylsulfid	0,38	0,45	1,442	290
Chloroform	0,40	0,57	1,443	245
Methylenchlorid	0,42	0,44	1,424	245
Methyl-isobutylketon	0,43	-	1,394	330
Tetrahydrofuran	0,45	-	1,408	220
Äthylendichlorid	0,49	0,79	1,445	230
Methyl-äthylketon	0,51	-	1,381	330
Nitropropan	0,53	-	1,400	380
Aceton	0,56	0,32	1,359	330
Dioxan	0,56	1,54	1,422	220
Äthylacetat	0,58	0,45	1,370	260
Methylacetat	0,60	0,37	1,362	260

Fortsetzung der Tabelle 1 :

Lösungsmittel	Polarität	Viskosität cP (20°)	Brechungs- index n	UV- Grenze nm
Amylalkohol	0,61	4,1	1,410	210
Dimethylsulfoxyd	0,62	2,24	-	-
Anilin	0,62	4,4	1,586	-
Diäthylamin	0,63	0,38	1,387	275
Nitromethan	0,64	0,67	1,394	380
Acetonitril	0,65	0,37	1,344	210
Pyridin	0,71	0,94	1,510	305
Butylcellosolve	0,74	-	-	220
Iso- + n-Propanol	0,82	2,3	1,38	210
Äthanol	0,88	1,20	1,361	210
Methanol	0,95	0,60	1,329	210
Äthylenglycol	1,11	19,9	1,427	210
Essigsäure	groß	1,26	1,372	-
Wasser	größer	-	1,333	-
Salze und Puffer	sehr groß	-	-	-

Die folgenden Tabellen enthalten Retentionsdaten für eine große Anzahl von Arzneisubstanzen, von denen jeweils der Freiname ³⁰⁸⁾ und die Spezialität angegeben sind, einmal an einer SIL X I (Kieselgel) Adsorptionssäule und zum anderen an einer Reverse-phase Säule C₁₈-SIL X. Die Daten sind nach ansteigender Nettoretentionszeit t_R' geordnet und für unterschiedlich polare Fließmittel tabelliert. Nach unseren Erfahrungen hat sich in praktisch allen pharmazeutischen Anwendungsfällen das System x % Dioxan/Eisessig (9 + 1) und (100-x) % n-Hexan für die Adsorptionschromatographie an Kieselgel bewährt. Beide Komponenten der mobilen Phase befinden sich in gesonderten Pumpen und können unmittelbar in jedem Verhältnis elektronisch konstant gemischt werden.

Für die Reverse-phase Chromatographie steht mit dem System Methanol/Wasser ein ebenso optimales Universalgemisch zur Verfügung. Hier wurden die Daten für eine Elutionsmittelzusammensetzung von 20 - 70 % tabelliert.

Tabelle 2 :

4.1. Retentionszeiten an einer Adsorptionssäule

LC-Gerät	: Perkin-Elmer 1220
Trennsäule	: V4A-Stahl; Länge = 50 cm; Innendurchmesser: 2,6 mm; Ofentemperatur: 22 ⁰ C
Stationäre Phase	: Handelsbezeichnung SIL X I (Kieselgel)
Mobile Phase	: % (Dioxan 9 T/ Eisessig 1 T) / n - Hexan
Strömungs- geschwindigkeit	: 1 ml / min
Druck	: 400 - 600 PSI
Totzeit, to	: 131 sec.
Detektor	: LC - 55 von Perkin-Elmer
Probe	: Substanz in Dioxan oder Dioxan/Eisessig

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Chlorophenotane	44	41	38	29
DDT	0,33	0,31	0,29	0,22
Phenylsalicylat	52	52	17	15
Salol	0,40	0,40	0,13	0,12
2-Nitrophenol	66	49	37	35
--	0,50	0,37	0,28	0,27
Danthron	69	64	60	11
Istizin	0,53	0,50	0,46	0,09
Thyloquinone	71	66	66	54
Menadion	0,54	0,51	0,50	0,42
Mefenaminsre.	78	55	49	49
Parkemed	0,60	0,42	0,38	0,38
3,5-Dichlor- benzoesäure	108	65	55	29
--	0,82	0,49	0,42	0,22
Flufenaminsäure	108	57	51	48
Arlef	0,83	0,43	0,39	0,37
Sorbinsäure	122	76	60	58
--	0,93	0,58	0,46	0,44
Diacetylamino- azotoluol	123	111	54	8
Pellidol	0,94	0,85	0,42	0,06
Anetholtrithion	124	79	57	36
Felviten	0,94	0,60	0,43	0,27
Benzoessäure	126	111	69	12
--	0,96	0,85	0,53	0,09
3,4-Dichlor- benzoessäure	131	53	42	22
--	1,0	0,40	0,32	0,17
Narcobarbital	141	70	56	49
Eunarcon	1,08	0,54	0,43	0,38
2,5-Dichlor- benzoessäure	154	135	74	39
--	1,17	1,03	0,56	0,30
Salicylsäure	169	63	22	12
--	1,29	0,48	0,17	0,09
Phenol	172	109	57	52
--	1,31	0,83	0,43	0,40

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
8-Hydroxychinolin	174	133	117	49
--	1,33	1,04	0,89	0,38
Phenylchinolin- carbonsäure	175	109	50	19
--	1,34	0,84	0,38	0,15
Mandelsäure- benzylester	195	73	52	12
--	1,49	0,56	0,40	0,10
Methylphenobar- bital	196	71	24	13
Prominal	1,49	0,54	0,18	0,11
Carbromal	199	75	53	15
Adalin	1,52	0,57	0,41	0,12
Phenobarbital	203	130	64	18
Luminal	1,55	0,99	0,49	0,14
p-Chlorphenol	204	94	72	35
--	1,55	0,72	0,55	0,27
2,6-Dichlor- benzoesäure	217	94	79	35
--	1,65	0,72	0,60	0,27
Hexylparaben	226	152	79	59
--	1,72	1,16	0,60	0,45
Aethyl-bis- cumacetat	232	81	68	15
Tromexan	1,77	0,62	0,52	0,11
Phenylbutazon	232	67	52	51
Butazolidin	1,77	0,51	0,40	0,40
Propallylonal	249	134	57	49
Noctal	1,90	1,02	0,43	0,37
Propylparaben	250	110	54	20
Nipasol	1,90	0,84	0,41	0,16
	257	54	15	10
Bilevon M	1,96	0,41	0,12	0,08
Aclofenac	259	109	77	12
Neoston	1,98	0,83	0,59	0,10
Methylprylon	289	117	14	12
Noludar	2,20	0,89	0,10	0,09

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Benzocain	290	177	77	51
Anaesthesin	2,21	1,35	0,59	0,39
Benzosulfimid	294	182	108	54
Sacharin	2,24	1,39	0,83	0,41
Tolbutamid	301	83	50	15
Rastinon	2,29	0,63	0,38	0,12
Monophenylbutazon	302	77	50	15
Butazophen	2,30	0,59	0,38	0,11
p-Hydroxybenzoe- säure	305	201	118	51
--	2,32	1,53	0,90	0,39
Aethylparaben	306	128	64	44
--	2,33	0,97	0,49	0,33
Glutethimid	306	114	64	44
Doriden	2,33	0,87	0,49	0,33
Bromvalurea	310	110	64	19
Bromural	2,36	0,84	0,49	0,15
Chlorpropamid	313	111	55	15
Chloronase	2,39	0,85	0,42	0,12
2-Aminobenzoe- säure	314	129	80	45
--	2,39	0,98	0,61	0,34
Barbital	319	111	54	19
Veronal	2,43	0,85	0,42	0,15
Methylparaben	319	184	69	60
Nipagin	2,43	1,41	0,53	0,46
Methaqualon	323	112	61	24
Revonal	2,46	0,85	0,47	0,18
Butallylonal	349	116	68	37
Pernocton	2,66	0,88	0,52	0,28
Acetylsalicyl- säure	351	125	60	18
Aspirin	2,68	0,95	0,46	0,14
Phenindion (1,3)	355	79	54	18
Trombasal	2,70	0,60	0,41	0,14
O-Äthoxybenzamid	357	139	73	57
--	2,72	1,06	0,56	0,44

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Propyphenazon	366	128	64	23
--	2,79	0,98	0,49	0,18
Phenprobamat	412	177	69	62
Gamaquil	3,14	1,35	0,53	0,47
Acetylsalicyl- säureanhydrid	413	129	63	20
Asan	3,15	0,98	0,48	0,16
Hydroxychlor- phenylsulfid	414	119	57	17
Novex	3,15	0,91	0,44	0,13
Vanillin	416	133	67	51
--	3,17	1,02	0,52	0,39
Hexobarbital	424	77	24	8
Evipan	3,23	0,59	0,18	0,06
Diazepam	471	172	117	52
Valium	3,58	1,33	0,89	0,40
--	486	133	76	22
Centalun	3,70	1,02	0,58	0,17
Acetylcarbromal	494	140	73	48
Abasin	3,76	1,07	0,56	0,37
Pyriethylidon	549	175	109	51
Persedon	4,18	1,34	0,84	0,39
Lactylphenitidin	549	255	126	61
Lactophenin	4,18	1,95	0,96	0,47
Phenallymal	552	174	54	48
Alphenal	4,21	1,33	0,42	0,37
Sulfinpyrazon	592	493	177	115
Anturano	4,51	3,76	1,35	0,88
Tolazamide	595	135	108	18
Norglycin	4,53	1,03	0,83	0,14
Phenopyrazon	603	175	71	69
Osadrin	4,59	1,34	0,54	0,53
Oxazepam	616	304	127	60
Adumbran	4,69	2,32	0,97	0,46
Acetohexamide	617	139	84	17
Dymelor	4,70	1,06	0,64	0,13

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Acetanilid	651	204	111	78
Antifebrin	4,96	1,55	0,84	0,60
Nicotinsäure	709	316	121	72
Niconacid	5,40	2,41	0,93	0,55
Salicylamid	711	228	83	67
Salizell	5,41	1,74	0,63	0,51
Diphenan	716	199	112	50
Butolan	5,45	1,52	0,85	0,38
Oxyphenbutazon	726	306	78	74
Tanderil	5,55	2,33	0,60	0,57
Sulthiam	836	415	237	130
Ospolot	6,37	3,16	1,81	0,99
Phenytoin	855	298	77	52
Zentropil	6,51	2,27	0,59	0,40
3,4-Dinitro- benzoesäure	910	242	113	55
--	6,93	1,84	0,85	0,42
Phthalsäure	917	291	112	55
--	6,98	2,21	0,85	0,42
Nicethamid	955	560	288	135
Coramin	7,27	4,26	2,20	1,03
Medazepam	969	372	201	177
Nobrium	7,38	2,84	1,53	1,35
Methylthiourazil	972	482	202	76
--	7,40	3,67	1,54	0,58
Carbamazepin	979	307	117	81
Tegretal	7,45	2,34	0,89	0,62
Resorcin	1251	348	114	63
--	9,53	2,65	0,87	0,48
Phenetolcarbamid	1257	422	303	133
Dulcin	9,57	3,21	2,31	1,02
p-Aminosalicyl- säure	1267	325	137	75
Aminox	9,64	2,47	1,04	0,57
2,6-Dinitro- benzoesäure	1366	334	142	68
--	10,40	2,54	1,08	0,52
Nitrazepam	1392	304	117	108
Mogadan	10,60	2,32	0,89	0,83

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Phenacetin	1749	412	142	114
Phenacetinum	13,32	3,14	1,09	0,87
Glibenclamid	1865	426	124	57
Euglucon 5	14,20	3,25	0,95	0,44
Gulaphesin	2148	434	168	129
Sirotol	16,35	3,31	1,28	0,99
Metamizol	--	154	79	63
Novalgin	--	1,17	0,60	0,48
Carbimazol	--	258	124	74
Neothyreostat	--	1,96	0,94	0,56
Tribenzazolin	--	342	111	54
Thyreocordon	--	2,60	0,84	0,41
Pikrinsäure	--	481	134	68
	--	3,66	1,02	0,52
Mefrusid	--	496	124	73
Baycaron	--	3,77	0,94	0,56
Carbutamid	--	715	197	77
Invenol	--	5,44	1,50	0,59
Chlordiazepoxid	--	775	423	236
Librium Base	--	5,90	3,22	1,80
Theophyllin	--	800	373	232
--	--	6,09	2,84	1,77
Furosemid	--	869	174	83
Lasix	--	6,61	1,32	0,63
Nitrofuracou	--	879	253	147
Furacin	--	6,69	1,93	1,12
Prothionamid	--	902	529	261
Ektebin	--	6,87	4,03	1,99
Coffein	--	954	480	262
--	--	7,26	3,66	2,00
Paracetamol	--	978	528	231
Ben-u-ron	--	7,44	4,02	1,76
Amidopyrin	--	1069	516	266
Pyramidon	--	8,14	3,93	2,02
Sulfafurazol	--	1082	306	118
Gantrisin	--	8,24	2,33	0,90
Chloramphenicol	--	1140	249	119
Leukomydin	--	8,68	1,89	0,90

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Nitrofurantoin	--	1151	294	86
Furadantin	--	8,76	2,24	0,65
Nicotinsäure- amid	--	1251	735	420
Nicobion	--	9,53	5,59	3,20
Metronidazol	--	1377	539	304
Clont	--	10,48	4,10	2,31
Sulfaphenazol	--	1490	408	135
Orisul	--	11,34	3,11	1,03
Sulfamerazin	--	1557	426	147
Debenal M	--	11,85	3,25	1,12
Chlorthalidon	--	1609	304	131
Hygroton	--	12,25	2,31	1,00
Cyclopentthiazid	--	1627	233	195
Navidrex	--	12,38	1,77	0,80
Acetazolamid	--	1742	445	177
Diamox	--	13,26	3,39	1,35
Sulfacetamid	--	1848	437	129
Albucid	--	14,07	3,33	0,98
Sulfadiazin	--	1985	536	186
Debenal	--	15,11	4,08	1,42
Sulfamethoxy- diazin	--	2034	477	174
Durenat	--	15,48	3,63	1,33
Sulfanilamid	--	2230	543	174
Prontalbin	--	16,97	4,14	1,33
Benzthiazid	--	--	513	159
Exosalt	--	--	3,90	1,21
Sulfathiourea	--	--	519	140
Badional	--	--	3,95	1,07
Sulfacarbamid	--	--	588	193
Euvernil	--	--	4,48	1,47
Ascorbinsäure	--	--	618	259
Vitamin C	--	--	4,70	1,97
Chlorothiazid	--	--	653	149
Chlotride	--	--	4,97	1,13

	10 %	20 %	30 %	40 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Furazolidon	--	--	658	265
Furoxon	--	--	5,01	2,02
Aethionamid	--	--	719	407
Iridocin	--	--	5,47	3,10
Sulfamoxol	--	--	838	243
Tardamid	--	--	6,38	1,85
Sulfisomidin	--	--	852	370
Elkosin	--	--	6,48	2,82
Hydroflumethiazid	--	--	1107	334
Rodiuran	--	--	8,42	2,54
Sulfathiazol	--	--	1146	367
Eleudron	--	--	8,73	2,80
Phthallyl-				
sulfathiazol	--	--	1608	378
Taleudron	--	--	12,24	2,88
Hydrochloro-				
thiazid	--	--	--	549
Esidrix	--	--	--	4,18
Sulfaguanidin	--	--	--	1128
Resulfon	--	--	--	8,59
Isoniacid	--	--	--	1149
Neoteben	--	--	--	8,74

Tabelle 3 :

4.2. Retentionszeiten an einer Reverse-phase Säule

LC-Gerät	: Perkin-Elmer 1220
Trennsäule	: V4A-Stahl; Länge = 25 cm; Innendurchmesser: 4 mm; Ofentemperatur: 22 ^o C
Stationäre Phase	: Handelsbezeichnung C ₁₈ - SIL X Teilchendurchmesser: 10 µm
Mobile Phase	: % Methanol / Wasser
Strömungs- geschwindigkeit	: 1 ml / min
Druck	: 1000 - 1200 PSI
Totzeit, t ₀	: 87 sec.
Detektor	: LC - 55 von Perkin-Elmer
Probe	: Substanz in Methanol oder Methanol / Wasser

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Oxalsäure	43	42	42	38
--	0,49	0,48	0,48	0,44
2,6-Dinitro- benzoesäure	48	43	38	33
--	0,55	0,49	0,44	0,38
Ascorbinsäure	48	48	48	48
Cebion	0,55	0,55	0,55	0,55
Metamizol	56	10	10	10
Novalglin	0,64	0,12	0,12	0,12
Citronensäure	58	48	43	43
--	0,67	0,55	0,49	0,49
Benzosulfimid	68	53	33	21
Sacharin	0,78	0,61	0,38	0,24
Nikotinsäure	83	78	74	60
--	0,95	0,90	0,85	0,69
Pikrinsäure	88	60	40	22
--	1,01	0,69	0,46	0,25
Xanthin	92	84	82	80
--	1,06	0,97	0,94	0,92
Sulfaguanidin	97	77	61	54
Resulfon	1,11	0,89	0,70	0,62
2,4-Dinitro- benzoesäure	105	78	59	42
--	1,21	0,90	0,68	0,48
Sulfathiourea	111	83	73	59
Badional	1,28	0,95	0,84	0,68
Sulfanilamid	113	88	61	53
Prontalbin	1,30	1,01	0,70	0,61
Sulfacarbamid	128	89	65	58
Euvernil	1,47	1,02	0,75	0,67
Phthalsäure	140	94	61	48
--	1,61	1,08	0,70	0,55
Thiamazol	141	102	83	58
Favistan	1,62	1,17	0,95	0,67
3,4-Dinitro- benzoesäure	151	58	56	54
--	1,74	0,67	0,64	0,62

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Isoniacid	161	103	88	71
Neoteben	1,85	1,18	1,01	0,82
Methylthiourazil	163	106	89	77
Thyreostad	1,87	1,22	1,02	0,89
Nicotinamid	190	117	83	58
Nicobion	2,18	1,35	0,95	0,67
Chlorothiazid	196	120	73	51
Chlotride	2,25	1,38	0,84	0,59
Hydrochlorothiazid	221	118	65	53
Esidrix	2,54	1,36	0,75	0,61
Salizylsäure	234	158	118	80
--	2,69	1,82	1,36	0,92
Acetazolamid	243	75	74	56
Diamox	2,79	0,86	0,85	0,64
Theobromin	259	133	96	81
--	2,98	1,53	1,1	0,93
Sulfadiazin	272	150	133	56
Debenal	3,13	1,72	1,53	0,64
Paracetamol	272	150	99	64
Ben-u-ron	3,13	1,72	1,14	0,74
PAS	273	173	93	53
Aminox	3,14	2,0	1,07	0,61
Resorcin	287	179	87	81
--	3,3	2,06	1,00	0,93
Metronidazol	305	180	112	89
Clont	3,51	2,07	1,29	1,02
Sulfathiazol	350	156	71	69
Eleudron	4,02	1,79	0,82	0,79
Sulfisomidin	372	185	112	69
Elkosin	4,28	2,13	1,29	0,79
Phthalyl-				
sulfathiazol	383	212	114	75
Taleudron	4,4	2,44	1,31	0,86
Sulfafurazol	393	252	116	85
Gantrisin	4,52	2,9	1,33	0,98

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Hydroflumethiazid	467	192	80	69
Rodiuran	5,37	2,21	0,92	0,79
Sulfamerazin	533	208	89	81
Debenal M	6,13	2,39	1,02	0,93
Theophyllin	533	208	94	69
--	6,13	2,39	1,08	0,79
Nitrofurantoin	537	233	96	66
Furadantin	6,17	2,68	1,10	0,76
Phenindion (1,3)	538	253	122	44
Thrombasal	6,18	2,91	1,40	0,51
2,5-Dichlor- benzoesäure	573	334	183	125
--	6,59	3,84	2,10	1,44
Nitrofuracon	634	292	109	80
Furacin	7,29	3,36	1,25	0,92
Sulfacetamid	638	150	120	113
Albucid	7,33	1,72	1,38	1,30
p-Hydroxi- benzoesäure	648	279	111	67
--	7,45	3,21	1,28	0,77
Sulfamoxol	674	252	84	58
Tardamid	7,75	2,90	0,97	0,67
Furazolidon	703	284	111	90
Furoxon	8,08	3,26	1,28	1,03
Sulthiam	729	260	97	57
Ospolot	8,38	3,06	1,12	0,66
2-Amino- benzoesäure	821	465	180	109
--	9,44	5,35	2,07	1,25
Phenol	872	531	200	121
--	10,02	6,10	2,30	1,39
Tribenzazolin	1157	271	131	77
Thyreocordon	13,30	3,12	1,51	0,89
Phenopyrazon	--	222	84	47
Osadrin	--	2,55	0,97	0,54
Phenetolcarbamid	--	243	97	93
Dulcin	--	2,80	1,12	1,07

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Sulfamethoxydiazin	--	266	95	62
Durenat	--	3,06	1,09	0,71
Chlorthalidon	--	283	132	63
Hygroton	--	3,25	1,52	0,72
Acetylsalicylsäure	--	293	187	100
Aspirin	--	3,37	2,15	1,15
Chloramphenicol	--	303	213	96
Leukomyacin	--	3,48	2,45	1,1
Sulfachinidin	--	312	105	67
Dimethyldebenal	--	3,59	1,21	0,77
Carbimazol	--	323	145	79
Neothyreostat	--	3,71	1,67	0,91
Coffein	--	323	183	83
--	--	3,71	2,1	0,95
Barbital	--	411	158	95
Veronal	--	4,72	1,82	1,09
Thioazetazon	--	493	116	83
Conteben	--	5,67	1,33	0,95
Vanillin	--	498	157	88
--	--	5,72	1,81	1,01
Nicethamid	--	519	285	240
Coramin	--	5,97	3,28	2,76
Salicylamid	--	539	159	95
Salizell	--	6,2	1,83	1,09
Pyrithylidon	--	541	173	103
Persedon	--	6,22	1,99	1,18
Phenazon	--	582	179	92
Antipyrin	--	6,69	2,06	1,06
Acetanilid	--	584	188	113
Antifebrin	--	6,71	2,16	1,30
--	--	629	189	94
Centalun	--	7,23	2,17	1,08
Sulfinpyrazon	--	718	208	165
Anturano	--	8,25	2,39	1,90
Guiaphesin	--	768	170	94
Sirotol	--	8,83	1,95	1,08

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Sulfaphenazol	--	779	147	80
Orisul	--	8,95	1,69	0,92
Sorbinsäure	--	813	291	113
--	--	9,34	3,34	1,30
Aethyl-bis-cumacetat	--	873	79	49
Tromexan	--	10,03	0,91	0,56
Furosemid	--	926	171	66
Lasix	--	10,64	1,97	0,76
Methypylon	--	939	241	105
Noludar	--	10,79	2,77	1,21
Carbutamid	--	940	191	77
Invenol	--	10,80	2,20	0,89
Phenacetin	--	1080	281	114
Phenacetinum	--	12,41	3,23	1,31
Phenobarbital	--	1083	318	96
Luminal	--	12,45	3,66	1,1
Bromvalurea	--	1211	298	124
Bromural	--	13,92	3,43	1,43
Phenylchinolin-carbonsäure	--	1288	261	103
--	--	14,80	3,00	1,18
o-Äthoxybenzamid	--	1342	258	184
--	--	15,43	2,97	2,11
Benzoessäure	--	1453	276	136
--	--	16,70	3,17	1,56
2-Nitrophenol	--	1515	658	178
--	--	17,41	7,56	2,05
Chlorophenotane	--	--	273	4
DDT	--	--	3,14	0,05
Mefrusid	--	--	275	94
Baycaron	--	--	3,16	1,08
Lactylphenetidin	--	--	281	107
Lactophenin	--	--	3,23	1,23
Methylparaben	--	--	285	110
Niragin	--	--	3,28	1,26

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Propallylonal	--	--	315	111
Noctal	--	--	3,62	1,28
Phenallymal	--	--	336	105
Alphenal	--	--	3,86	1,21
Benzocain	--	--	355	236
Anaesthesin	--	--	4,08	2,71
2,4-Dichlor- benzoesäure	--	--	360	208
--	--	--	4,14	2,39
Benzthiazid	--	--	393	105
Exosalt	--	--	4,52	1,21
Hexobarbital	--	--	467	158
Evipan	--	--	5,37	1,82
Methylphenobarbital	--	--	502	124
Prominal	--	--	5,77	1,43
Aethylparaben	--	--	509	133
--	--	--	5,85	1,6
Phenythoin	--	--	523	125
Zentropil	--	--	6,01	1,44
p-Chlorphenol	--	--	525	179
--	--	--	6,03	2,06
Gluthetimid	--	--	543	172
Doriden	--	--	6,24	1,98
Chlorpropamid	--	--	556	137
Chloronase	--	--	6,39	1,58
Cyclopenthiazid	--	--	566	111
Navidrex	--	--	6,51	1,28
Carbromal	--	--	577	170
Adalin	--	--	6,63	1,95
Butallylonal	--	--	580	178
Pernocton	--	--	6,67	2,05
Carbamazepin	--	--	623	160
Tegretal	--	--	7,16	1,84
Propyphenazon	--	--	641	181
--	--	--	7,37	2,08
Acetohexamid	--	--	658	145
Dymelor	--	--	7,56	1,67

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Nitrazepam	--	--	668	135
Mogadan	--	--	7,68	1,55
Phenprobamat	--	--	668	153
Gamaquil	--	--	7,68	1,76
Narcobarbital	--	--	742	133
Eunarcon	--	--	8,53	1,53
Monophenylbutazon	--	--	751	134
Butazophen	--	--	8,63	1,54
Tolbutamid	--	--	794	115
Rastinon	--	--	9,15	1,32
Oxyphenbutazon	--	--	813	163
Tanderil	--	--	9,35	1,87
Acetylcarbromal	--	--	819	200
Abasin	--	--	9,41	2,3
Tolazamide	--	--	923	192
Norglycin	--	--	10,61	2,21
Methaqualon	--	--	999	200
Revonal	--	--	11,48	2,30
Propylparaben	--	--	1005	195
Nipasol	--	--	11,55	2,24
Tyloquinone	--	--	1011	259
Menadion	--	--	11,62	2,98
Oxazepam	--	--	1032	274
Adumbran	--	--	11,86	3,15
3,5-Dichlor- benzoesäure	--	--	1043	188
--	--	--	11,99	2,16
3,4-Dichlor- benzoesäure	--	--	1078	252
--	--	--	12,39	2,90
Acetylsalicyl- säureanhydrid	--	--	1258	247
Asan	--	--	14,46	2,84
Mandelsäure- benzylester	--	--	1403	256
--	--	--	16,13	2,94

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
Diphenan	--	--	1673	284
Butolan	--	--	19,23	3,26
Glibenclamid	--	--	--	161
Euglucon 5	--	--	--	1,85
Aclofenac	--	--	--	205
Neoston	--	--	--	1,85
Diazepam	--	--	--	233
Valium	--	--	--	2,68
Hexylparaben	--	--	--	269
--	--	--	--	3,09
Phenylsalicylat	--	--	--	270
Salol	--	--	--	3,10
Diacetylaminoo- azotoluol	--	--	--	278
Pellidol	--	--	--	3,20
Phenylbutazon	--	--	--	407
Butazolidin	--	--	--	4,68
--	--	--	--	453
Bilevon M	--	--	--	5,21
Procarbazin	--	--	--	507
Natulan	--	--	--	5,83
Danthron	--	--	--	573
Istizin	--	--	--	6,59
Hydroxychlor- phenylsulfid	--	--	--	603
Novex	--	--	--	6,93
Aethionamid	--	--	--	663
Iridocin Base	--	--	--	7,62
Anetholtrithion	--	--	--	685
Felviten	--	--	--	7,87
Prothionamid	--	--	--	819
Ektebin	--	--	--	9,41
Amidopyrin	--	--	--	890
Pyramidon	--	--	--	10,23
Flufenaminsäure	--	--	--	1020
Arlef	--	--	--	11,71

	20 %	30 %	50 %	70 %
Substanz	t' R k'	t' R k'	t' R k'	t' R k'
8-Hydroxychinolin	--	--	--	1043
--	--	--	--	11,99
Mefenaminsäure	--	--	--	1093
Parkemed	--	--	--	12,56
Dipyridamol	--	--	--	1178
Persantin	--	--	--	13,54
Chlordiazepoxid	--	--	--	2048
Librium Base	--	--	--	23,54
Medazepam	--	--	--	--
Nobrium	--	--	--	--

4.3. Um beim Optimieren einen Überblick über die gewünschte Retentionszeit zu erhalten, ist es wichtig, die Abhängigkeit dieser von der Polarität des Eluenten, der Strömungsgeschwindigkeit und der Temperatur zu kennen.

4.3.1. Abhängigkeit der Nettoretentionszeit von der Polarität der mobilen Phase

stationäre Phase : SIL X II, l = 50 cm, Innendurchmesser = 2,6 mm

mobile Phase : % (Dioxan 9 T/Eisessig 1 T)/n-Hexan v/v

Ofentemperatur : 22° C

Strömungsgeschw. : 1 ml / min

Druck : keine Manometeranzeige

t₀ : 93 sec

Nach jeder Einstellungsänderung wurden 15 min gewartet.

Tabelle 4 :

Sulfanilamid		Paracetamol		Coffein		Resorcin		Benzocain	
%	t'sec R	%	t' R	%	t' R	%	t' R	%	t' R
14	732	11	800	5	1037	5	379	5	95
16	491	14	406	6	752	6	208	6	69
18	322	17	236	7	628	7	155	7	58
20	259	20	169	8	480	8	118	8	49
25	127	23	110	9	417	9	92	9	39
30	70	26	80	10	287	10	65	10	30
35	39	29	59	12	220	12	40	12	20
40	24	32	44	14	158	14	26	14	14
		35	34	16	119	16	17	16	9
				18	94	18	12	18	5
				20	72	20	7	20	2
				22	58				
				25	43				
				30	27				

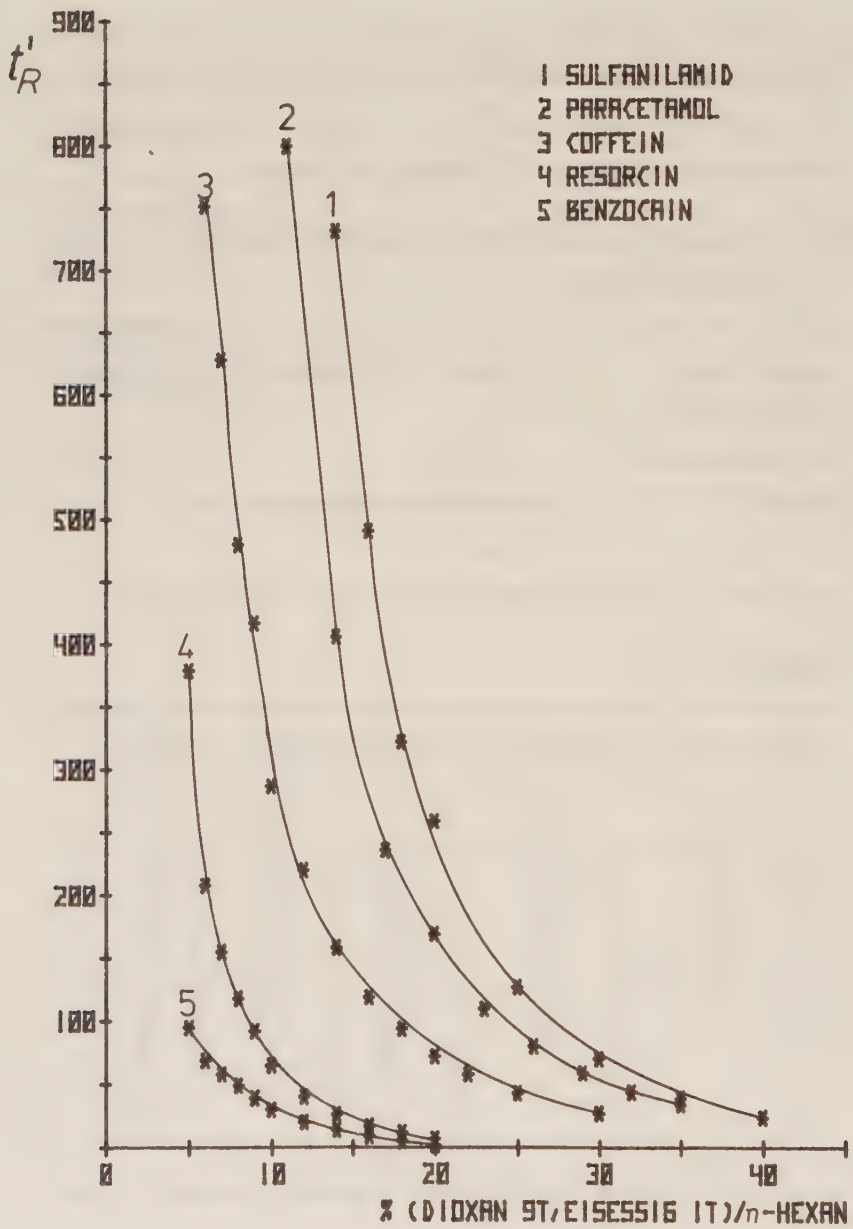


Abb. 5

4.3.2. Abhängigkeit der Nettoretentionszeit von der Strömungs- geschwindigkeit

stationäre Phase : SIL X II, l = 50 cm, $\phi_i = 2,6$ mm
mobile Phase : Dioxan (9), Eisessig (1), n-Hexan (90) v/v
bei Paracetamol;
Dioxan (5,4), Eisessig (0,6), n-Hexan (94) v/v
bei Coffein, Resorcin, Nitrazepam
Ofentemperatur : 22° C
Strömungsgeschw. : s. Tabelle
Druck : stieg mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit
Nach jeder Einstellungsänderung wurden 15 min gewartet.

Tabelle 5 :

ml/min	t_0 /sec	Paracetamol	Coffein	Resorcin	Nitrazepam
		t'_R /sec	t'_R /sec	t'_R /sec	t'_R /sec
0,5	170	-	-	289	1077
1	93	970	752	208	475
1,5	60	590	511	145	328
2	45	500	441	131	286
2,5	35	420	351	106	240
3	29	336	288	85	202
3,5	24	271	240	75	167
4	22	228	197	60	137
4,5	19	186	189	54	123
5	17	178	148	42	121
5,5	15	165	131	39	118

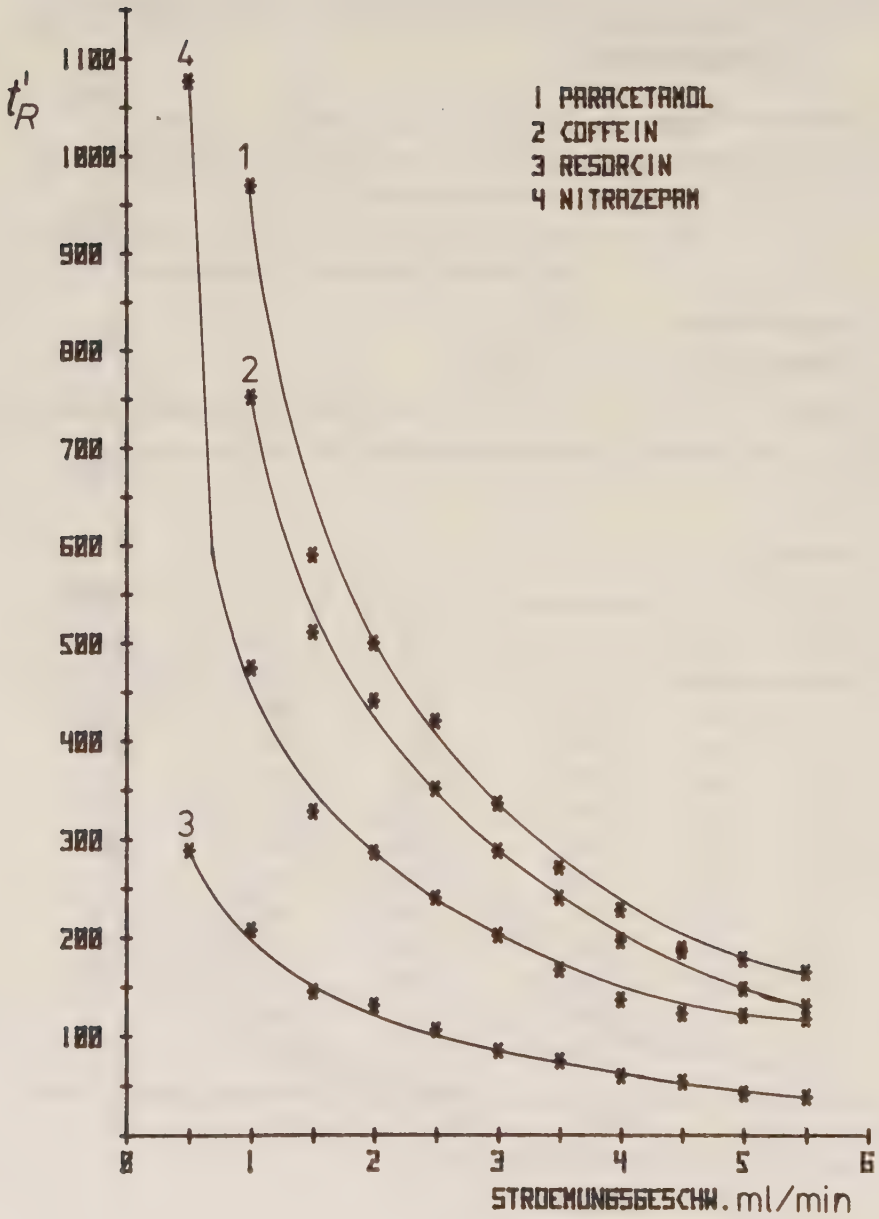


Abb. 6

4.3.3. Abhängigkeit der Nettoretentionszeit von der Temperatur

stationäre Phase : SIL X II, l = 50 cm, $\phi_i = 2,6$ mm
mobile Phase : Dioxan (9), Eisessig (1), n-Hexan (90) v/v
bei Paracetamol;
Dioxan (5,4), Eisessig (0,6), n-Hexan (94) v/v
bei Coffein, Resorcin, Nitrazepam
Ofentemperatur : s. Tabelle
Strömungsgeschw. : 1 ml / min
Druck : keine Manometeranzeige
 t_0 : 93 sec

Nach jeder Einstellungsänderung wurden 15 min gewartet.

Der Siedepunkt von n-Hexan liegt bei 69° C.

Tabelle 6 :

	Paracetamol	Coffein	Resorcin	Nitrazepam
Temp. °C	t'_R / sec	t'_R /sec	t'_R /sec	t'_R /sec
22	1187	757	212	523
25	837	662	191	474
30	717	609	174	412
35	627	543	161	395
40	567	491	153	375
45	517	463	143	358
50	487	432	128	339
55	432	395	122	318
60	402	357	107	300
65	357	327	102	287

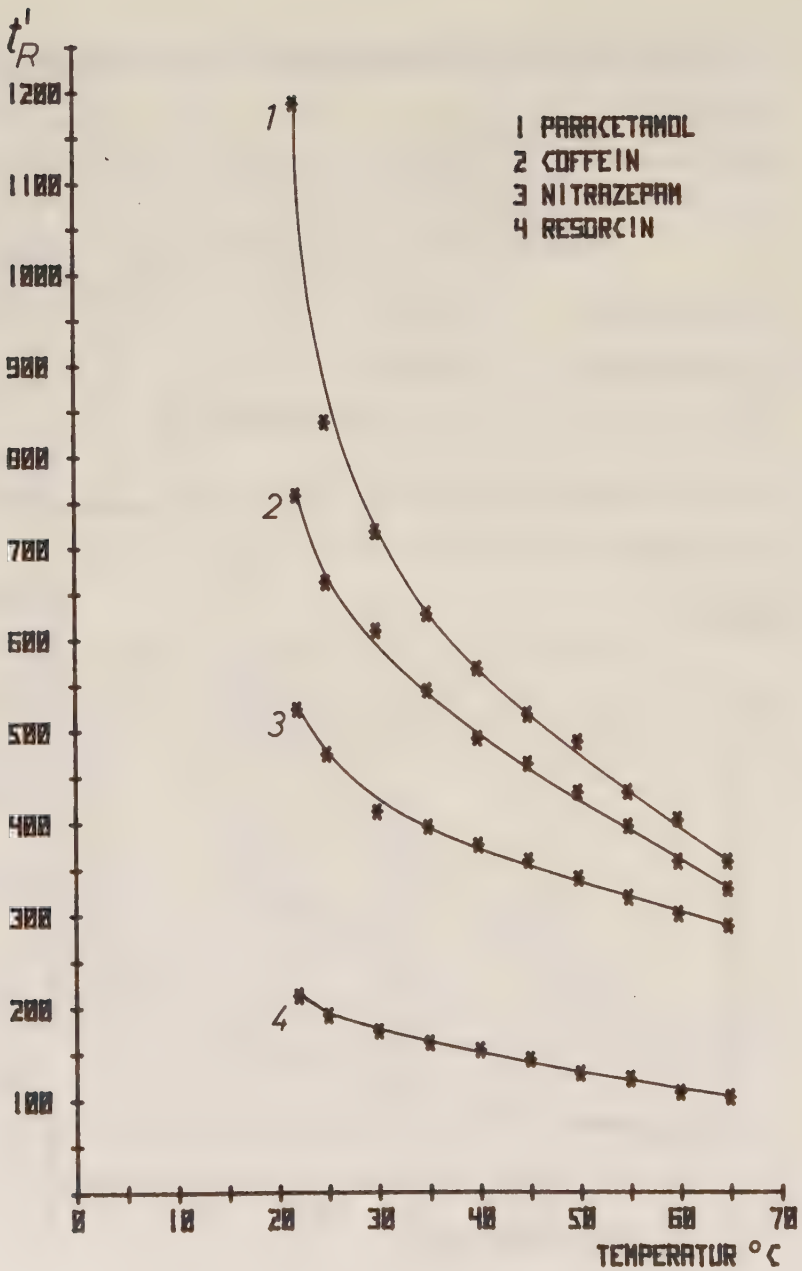


Abb. 7

5. Qualitative Trennungen

Hauptanwendungsgebiete chromatographischer Trennverfahren sind einmal die Identifizierung und zum anderen die quantitative Bestimmung relativ ähnlich gebauter Substanzen, da in diesem Fall chemische Methoden zu wenig oder überhaupt nicht spezifizieren können. Bei der Identifizierung von Arzneisubstanzen bereitet es im allgemeinen keine besonderen Schwierigkeiten, die Arzneimittelgruppe (wie z.B. Sulfonamiddiuretika, Barbiturate) mit einfachen Mitteln festzustellen. Die Unterscheidung der sehr ähnlichen und somit leicht zu verwechselnden Einzelsubstanzen soll an einigen ausgewählten Beispielen hier vorgestellt werden. Um eine Trennung durchzuführen, verschaffe man sich anhand voriger Tabellen einen Überblick über die Retentionszeiten der Substanzen und wende dann verschiedene Optimierungsmöglichkeiten an.

Die Auflösung (R) zweier Banden ist definiert durch den Abstand der beiden Peakmaxima voneinander und dem arithmetischen Mittel der Peakbasisbreite (w), die man als Abschnitt der Grundlinie zwischen den Wendetangenten der Peaks erhält.

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

Man strebt in der Chromatographie eine optimale Auflösung an, d.h. die Peaks sollen nur so weit wie nötig voneinander getrennt werden. Bei Gauß'schen Kurven sind die Peaks bei einer Auflösung von 1,5 praktisch bis zur Basis getrennt.

Größere Auflösungen gehen auf Kosten der Analysenzeit.

Gearbeitet wurde mit einer Reverse-phase Säule (V4-A Stahl, $l = 25 \text{ cm}$, $\phi_1 = 4 \text{ mm}$, Sorbens: $10 \mu, C_{18}$), die eine große Selektivität besitzt, denn es werden chemisch ähnlich gebaute Substanzen sehr gut getrennt. Sie hat gegenüber polaren Sorbentien den Vorteil, daß auch unpolare Substanzen wie PHB-Ester getrennt werden können, was mit der Adsorption oder der DC nur schwer zu erreichen wäre.

Tabelle 7 : Qualitative Trennung von Pyrazolonen, Pyrazolidindionen

Mobile Phase: Methanol/Wasser 60 + 40 v/v; 1200 psi; 1 ml/min;

$T = 22^\circ \text{ C}$; $t_o = 87 \text{ sec}$; Detektion: UV 252 nm

Substanz	t_R'
Metamizol	10
Phenazon	137
Sulfinpyrazon	175
Propyphenazon	252
Monophenylbutazon	313
Oxyphenbutazon	353
Phenylbutazon	881
Aminophenazon	-

Aminophenazon wird unter diesen Bedingungen nicht eluiert und kann somit von den anderen Substanzen abgetrennt werden.

Tabelle 8 : Qualitative Trennung von analgetischen
Anilinderivaten

Mobile Phase: Methanol/Wasser 50 + 50 v/v; 1200 psi;
1 ml/min; T = 22° C; t_o = 87 sec; Detektion: UV 252 nm

Substanz	t'_R
Paracetamol :	99
Acetanilid :	188
Acetophenetidin :	281

Tabelle 9 : Qualitative Trennung von Xanthenen

Mobile Phase: Methanol/Wasser 30 + 70 v/v; 1300 psi;
1 ml/min; T = 22° C; t_o = 87 sec; Detektion: UV 273 nm

Substanz	t'_R
Xanthin :	84
Theobromin :	133
Theophyllin :	208
Coffein :	323

Tabelle 10 : Qualitative Trennung von Sulfonamiddiuretika

Mobile Phase: Methanol/Wasser 40 + 60 v/v; 1300 psi;
1 ml/min; T = 22° C; t₀ = 87 sec; Detektion: UV 252 nm

Substanz	t _R '
Hydrochlorothiazid :	85
Hydroflumethiazid :	110
Furosemid :	207
Chlorthalidon :	270
Benzthiazid :	847
Cyclopenthiazid :	1842

Tabelle 11 : Qualitative Trennung von hypnotischen Ureiden

Mobile Phase: Methanol/Wasser 65 + 35 v/v; 1100 psi;
1 ml/min; T = 22° C; t₀ = 87 sec; Detektion: UV 220 nm

Substanz	t _R '
Bromvalurea :	127
Carbromal :	180
Accecarbromal :	213

Tabelle 12 : Qualitative Trennung von Nitroheteroaromaten

Mobile Phase: Methanol/Wasser 20 + 80 v/v; 1100 psi;
1 ml/min; $T = 22^{\circ} \text{C}$; $t_0 = 87 \text{ sec}$; Detektion: UV 250 nm

Substanz	t_R'
Metronidazol :	305
Nitrofurantoin :	537
Nitrofurazon :	634
Furazolidon :	703

Tabelle 13 : Qualitative Trennung von PHB - Estern

Mobile Phase: Methanol/Wasser 60 + 40 v/v; 1200 psi;
1 ml/min; $T = 22^{\circ} \text{C}$; $t_0 = 87 \text{ sec}$; Detektion: UV 252 nm

Substanz	t_R'
p-Hydroxibenzoesäure :	84
Methylparaben :	163
Aethylparaben :	243
Propylparaben :	413

Tabelle 14 : Qualitative Trennung von Barbitursäuren
und einigen Amiden

Mobile Phase: Methanol/Wasser 45 + 55 v/v; 900 psi;
1 ml/min; T = 35° C; t_o = 87 sec; Detektion: UV 240 nm

Substanz	t'_R
Barbital :	123
Pyriethylydon :	158
Phenobarbital :	188
Methyprylon :	203
Phenallymal :	292
Hexobarbital :	457
Phenytoin :	517
Gluthetimid :	554
Narcobarbital :	727

Tabelle 15 : Qualitative Trennung von substituierten
Benzoessäurederivaten

Mobile Phase: Methanol/Wasser/Phosphorsäure 60+40+0,4 v/v;
1200 psi; 1 ml/min; T = 22° C; t_o = 87 sec; Detektion: UV 252 nm

Substanz	t'_R
2,6 Dinitrobenzoessäure:	23
2,6 Dichlorbenzoessäure:	103
3,4 Dinitrobenzoessäure:	143
Benzoessäure :	170
2,5 Dichlorbenzoessäure:	327
2,4 Dichlorbenzoessäure:	420
3,4 Dichlorbenzoessäure:	823
3,5 Dichlorbenzoessäure:	1023

6. Analysenauswertung und Berechnung

Da in der HPLC die Auswertung meist mit UV-Detektoren erfolgt, geht der Extinktionskoeffizient der Substanz mit in die Peakfläche ein. Bei Detektoren mit feststehender Wellenlänge können nicht alle Substanzen im Absorptionsmaximum vermessen werden. Es muß daher stoffspezifisch geeicht werden.

6.1. Auswerteverfahren

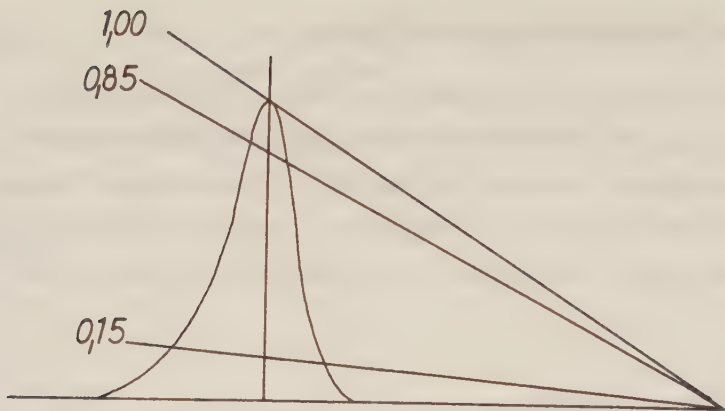
Um die erhaltenen Chromatogramme auszuwerten, wurden folgende fünf Verfahren angewandt:

- a) Peakhöhe
- b) elektronische Integration mit Integrator HP 3370 A
- c) Peakhöhe x Halbwertsbreite
- d) Peakhöhe x Gesamtretentionszeit

Die Retentionszeit des Peakmaximums wurde vom Integrator mit ausgedruckt.

- e) Peakhöhe x Breite nach Condall-Bosch

Hierbei wird auch das Tailing von Peaks mit berücksichtigt. Die Breite des Peaks wird mit einer Schablone bei 15 % ($b_{0,15}$) und 85 % ($b_{0,85}$) der Höhe bestimmt. Die beiden Werte werden addiert und durch zwei geteilt, so daß sich eine modifizierte Halbwertsbreite ergibt.



$$F = h \cdot \left(\frac{b_{0,15} + b_{0,85}}{2} \right)$$

Abb. 8

6.2. Quantitative Bestimmungsmethoden

Zur Berechnung der Analysen können neben der Methode des externen Standards und der Zumischmethode auch der interne Standard benutzt werden.

6.2.1. Externer Standard

Beim externen Standard werden mit Hilfe bekannter Substanzkonzentrationen Eichpunkte markiert, durch die dann eine Ausgleichsgerade gelegt wird. Es machen sich Einspritzfehler bemerkbar, da nicht jedesmal genau die gleiche Menge dosiert werden kann. Deshalb streuen die Eichpunkte mehr oder

weniger stark. Die berechnete Eichgerade ist somit mit einem gewissen Fehler behaftet, der sich in jeder Analyse bemerkbar macht.

6.2.2. Zumischmethode

Hierbei wird einer bekannten Substanz, die bereits in der Probe enthalten ist, eine bestimmte Menge zugesetzt. Um die Fläche zu bestimmen, die diese zugesetzte Menge einnimmt, müssen zwei Chromatogramme unter identischen Bedingungen erstellt werden, einmal ohne und einmal mit der Zuwaage. Es muß noch ein weiterer Peak vorhanden sein, der durch die Zumischung bei der Analysensubstanz nicht gestört wird, denn da sich die zum Chromatogramm verwendeten Mengen an Substanz nicht unbedingt gleichen, wird mit Hilfe dieser Bande auf gleiche Einspritzmengen umgerechnet. Ein Nachteil der Methode ist, daß nur eine Substanz genau ausgewertet werden kann und daß ein zusätzlicher Wägefehler bei der Zuwaage auftritt.

6.2.3. Interner Standard

Bei quantitativen Bestimmungen empfiehlt sich die Methode des internen Standards. Hierbei werden alle Peaks einer Analyse auf eine Vergleichssubstanz bezogen, die ebenfalls Teil des Chromatogramms ist. Die Berechnung erfolgt dann mit Hilfe eines Standardkorrekturfaktors. Es können leichte Veränderungen, die im Laufe der Analysenreihe an der Trennsäule ent-

stehen, aufgefangen werden. Die Retentionszeit des internen Standards sollte zwischen denen der Analysensubstanzen liegen, und die Peaks sollten sich nicht zu stark überlagern. Um Wägefehler zu eliminieren, wurde die hergestellte Lösung in Standard- und Analysenlösung geteilt. So erhält man eine Kontrolle des Gesamtfehlers und kann besser statistisch gesicherte Aussagen treffen.

6.3. Bestimmung des Standardkorrekturfaktors

Aus den ersten 10-12 Werten einer Lösung mit bekannter Zusammensetzung wurde der Standardkorrekturfaktor ermittelt. Dieser konnte allerdings als nicht ganz repräsentativ angesehen werden, da er nur den ersten Teil des Arbeitsvorganges erfaßte (Analysen: Adsorption 1-6). Da manchmal Veränderungen an der Säule zu einem Driften des Chromatogramms führen können, macht sich diese Art der Berechnung beim Mittelwert und bei der relativen Standardabweichung bemerkbar. Um dies auszugleichen, wurde abwechselnd Standard- und Analysenlösung eingespritzt und sofort die Analysenkomponenten aus dem vorangegangenen Standardchromatogramm berechnet. Auftretende Schwankungen können auf diese Art gut aufgefangen werden.

Ungenauigkeiten im Chromatogramm entstehen sehr leicht durch unvollständige Vermischung der Eluensflüssigkeit in der Mischzelle, zumal, wenn eine Komponente nur in geringer Menge vorhanden ist. Die richtige Zusammensetzung des Eluenten wurde deshalb in einem Vorversuch mit zwei Pumpen er-

mittelt, die fertig gemischte Lösung in nur einen Pumpenbehälter eingefüllt und die Trennungen hiermit gefahren (außer Adsorptionen 1-6).

Um gleichmäßig hohe Peaks bei jedem Chromatogramm zu bekommen, empfiehlt es sich, keine zu stark konzentrierten Lösungen einzuspritzen, da hierbei kleine Änderungen in dem Aufgabevolumen zu großen Unterschieden in der Peakhöhe führen, denn die veränderte Schreiberträgheit und die nicht vollständige Linearität der Adsorptionsisotherme entsprechen nicht mehr den Optimierungsbedingungen.

Der Standardkorrekturfaktor wird nach folgender Formel bestimmt:

$$f_{St} = \frac{A \cdot C}{B \cdot D}$$

f_{St} = Standardkorrekturfaktor

A = Einwaage Substanz in mg

B = Einwaage Standard in mg

C = Meßwert Standardpeak

D = Meßwert Substanzpeak

Aus den erhaltenen Korrekturfaktoren (x^*) wurden der Mittelwert ($\bar{x}$), die Standardabweichung (s) und die relative Standardabweichung (s_{rel}) berechnet.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x^* - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$s_{\text{rel}} = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}} \quad \%$$

Anschließend wurde eine Fehlerrechnung über den Ausreißertest nach Nalimov durchgeführt³⁰⁹⁾, da extrem hohe oder tiefe Werte, sogenannte Ausreißer, einer Wertereihe das Ergebnis verfälschen können. Je größer die Anzahl der Einzeldaten ist, desto besser können mögliche Ausreißer erkannt werden. Um diese Werte exakt eliminieren zu können, muß ein Kriterium gefunden werden, welches im Ausreißertest von Nalimov genau festgelegt ist.

6.4. Berechnung nach Nalimov³⁰⁹⁾

Für jeden Wert (x^*) wird ein r^* nach folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

r^* = Wert für r-Tabelle

x^* = einzelner Korrekturfaktor

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

$| |$ = Absolutbetrag

n = Anzahl der Messungen

Jeder erhaltene r^* Wert wird mit folgender Datentabelle auf einen Ausreißer hin untersucht, wobei $f = n - 2$ ist. Falls ein solcher vorliegt, muß solange der Ausreißertest wiederholt werden, wobei der Ausreißer (x^*) zu entfernen und $\bar{x}$ und s neu zu berechnen sind, bis alle Meßdaten als homogen zu betrachten sind.

Tabelle 16 : r - Tabelle 309)
(Ausreißertest nach Nalimov, Zahlen von
G. Gottschalk)

Statistische Sicherheit P in % :			
f	(95 %)	(99 %)	(99,9 %)
1	1,409	1,414	1,414
2	1,645	1,715	1,730
3	1,757	1,918	1,982
4	1,814	2,051	2,178
5	1,848	2,142	2,329
6	1,870	2,208	2,447
7	1,885	2,256	2,540
8	1,895	2,294	2,616
9	1,903	2,324	2,678
10	1,910	2,348	2,730
11	1,916	2,368	2,774
12	1,920	2,385	2,812
13	1,923	2,399	2,845
14	1,926	2,412	2,874
15	1,928	2,423	2,899

Entscheid 309):

Es ist kein Ausreißer feststellbar, wenn $r^* < r(95)$.
Ist r^* größer oder gleich $r(95)$, jedoch kleiner als $r(99)$,
so gilt: x^* ist wahrscheinlich ein Ausreißer. Ist r^* größer
oder gleich $r(99)$, jedoch kleiner $r(99,9)$, so gilt: x^* ist
signifikant ein Ausreißer. Ist r^* größer oder gleich $r(99,9)$,
dann gilt: x^* ist hochsignifikant ein Ausreißer.

Mit diesem sehr genau berechneten Korrekturfaktor werden
die Analysen nach folgender Formel berechnet:

$$E = \frac{B' \cdot D' \cdot f_{St}}{C'}$$

E = gefunden in mg

B' = Einwaage der Standardsubstanz in mg

D' = Meßwert Analysenpeak

f_{St} = Standardkorrekturfaktor

C' = Meßwert Standardpeak

Anschließend werden die Standardabweichung, die relative
Standardabweichung und der theoretische Prozentgehalt (T)
bestimmt:

$$T = \frac{E \cdot 100}{A} \quad \%$$

7. Quantitative Adsorptionschromatographie

Der größte Teil der Arzneispezialitäten enthält nur eine Wirksubstanz. Diese ist meist leicht zu bestimmen. Bei Kombinationspräparaten wurde bisher hauptsächlich die Ionenaustausch Chromatographie ^{31C-323)} herangezogen. Im Folgenden sollen die Analgetika und Antirheumatika mit Hilfe der Adsorptions- und Reverse-Phase Chromatographie bestimmt werden.

Da mir zeitweise nur ein Detektor mit feststehender Wellenlänge (254 nm) zur Verfügung stand, war es nicht möglich, die richtige Zusammensetzung der Arzneimittelspezialitäten einzuwiegen. Dies änderte sich durch Anwendung eines Detektors mit variabler Wellenlänge (LC - 55). Alle Proben wurden so vorbereitet, daß die Substanzen in der Eluentenzusammensetzung oder einer etwas polarerer Lösung gelöst wurden, um den Lösungsmittelpeak so klein wie möglich zu halten, denn er könnte bei Überlagerung mit dem ersten Analysenpeak diesen Wert verändern. Für reproduzierbare Messungen ist eine gut konditionierte Säule die Voraussetzung. Die Einlaufzeit betrug deshalb auch 1 Stunde.

LC-Gerät: Perkin-Elmer 1220

Trennsäule: V4A Stahl, Länge 50 cm, Innendurchmesser: 2,6 mm

stationäre Phase: SIL X II

Wellenlänge: 254 nm

7.1. Quantitative Bestimmung von Salicylamid

Interner Standard : Acetophenetidin
 Mobile Phase : % (Dioxan/Eisessig 9+1)/ n-Hexan v/v
 Es wurden sechs Bestimmungen mit ansteigender Polarität von 10-15 % ausgeführt.
 Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
 Druck : keine Manometeranzeige
 Einspritzmenge : 5 µl; Analysendauer: s. Tabelle 18
 Auswertung : Peakhöhe
 Spezialität : Salizell [®] (Byk-Gulden)
 Korrekturfaktor : aus 11 Messungen, Berechnung s. vorne
 Anzahl der Analysen : s. Tabelle 18

Tabelle 17 : Beispiel

Analysenlösung : 500 mg Salicylamid
 132 mg Acetophenetidin / 100 ml Dioxan
 Anzahl der Messungen: 8

Standardpeak	Analysenpeak	%
7,40	4,95	101,94
7,33	4,83	100,41
8,30	5,58	102,45
7,41	4,86	99,95
8,34	5,55	101,41
8,58	5,67	100,70
8,18	5,39	100,41
8,04	5,30	100,46

Gehalt an Salicylamid: 100,97 %

s_{rel} : 0,88 %

Tabelle 18 : Zusammenstellung der 6 Salicylamid Bestimmungen

Nr.	% polare Phase	s_{rel} %	Anzahl der Analysen	Gesamtretentionszeit, min
1.	10	0,87	8	7
2.	11	0,98	7	6
3.	12	0,85	9	5
4.	13	0,62	10	5
5.	14	0,82	9	4,5
6.	15	0,82	11	4

Obige Tabelle zeigt, daß kein Fehlermaximum oder -minimum bei Veränderung der Polarität existiert. Es dürfte deshalb in der HPLC kein analoger Fixpunkt zum Messen der Analyse bestehen wie in der UV-Spektroskopie das Absorptionsmaximum. Wichtig ist die Verkürzung der Analysenzeit von 7 auf 4 Minuten bei gleicher Genauigkeit.

7.2. Quantitative Bestimmung von Phenylbutazon

Interner Standard : Propyphenazon
 Mobile Phase : Dioxan (7,2), Eisessig (0,8),
 n-Hexan (92) v/v
 Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
 Druck : keine Manometeranzeige
 Einspritzmenge : 2 µl; Analysendauer: 3 min
 Spezialität : Butazolidin[®] (Geigy)
 Elmedal[®] (Thiemann)
 Korrekturfaktor : aus 13 Messungen
 Anzahl der Analysen : 10

Einwaage:

Phenylbutazon : 66,4 mg
 Standard : 65,2 mg/10 ml Dioxan + 20 ml Eluens
 Ergebnis : Tabelle 19:

Auswerteverfahren	Phenylbutazon	
	s _{rel} %	% d. Theorie
Peakhöhe	0,97	99,1
elektronische Integration	1,05	99,0
Peakhöhe x Halbwertsbreite	1,30	100,6
Peakhöhe x Gesamtretentionszeit	1,27	99,2
Condall-Bosch	1,64	99,0

7.3. Quantitative Bestimmung von Acetylsalicylsäure und

Acetophenetidin

Interner Standard : Phenytoin
 Mobile Phase : Dioxan (11,25), Eisessig (1,25),
 n-Hexan (87,5) v/v
 Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
 Druck : keine Manometeranzeige
 Einspritzmenge : 2,8 µl; Analysendauer: 5 1/2 min
 Spezialität : Aspiphenin[®] (Bayer)
 Korrekturfaktor : aus 12 Messungen
 Anzahl der Analysen : 8

Einwaage:

Acetylsalicylsäure : 145,0 mg
 Acetophenetidin : 25,6 mg
 Standard : 213,0 mg / 10 ml Dioxan + 5 ml Eluens

Ergebnis : Tabelle 20:

Auswerteverfahren	Acetylsalicylsäure		Acetophenetidin	
	s _{rel}	% d. Theorie	s _{rel}	% d. Theorie
Peakhöhe	0,39	99,9	0,56	100,2
elektronische Integration	0,80	100,0	0,80	99,9
Peakhöhe x Halbwertsbreite	1,04	99,4	1,13	100,3
Peakhöhe x Gesamtretentionszeit	0,71	100,3	0,50	99,6
Condall-Bosch	1,56	100,0	0,96	99,4

7.4. Quantitative Bestimmung von Phenylbutazon und Propyphenazon

Interner Standard : Salicylamid
 Mobile Phase : Dioxan (6,3), Eisessig (0,7),
 n-Hexan (93) v/v
 Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
 Druck : keine Manometeranzeige
 Einspritzmenge : 2 μ l; Analysendauer: 5 min
 Spezialität : Oxybuton retard [®] (Asche)
 Korrekturfaktor : aus 13 Messungen
 Anzahl der Analysen : 9

Einwaage:

Phenylbutazon : 65,6 mg
 Propyphenazon : 33,4 mg
 Standard : 202,0 mg / 10 ml Dioxan + 20 ml Eluens

Ergebnis : Tabelle 21 :

Auswerteverfahren	Phenylbutazon		Propyphenazon	
	s _{rel} %	% d. Theorie	s _{rel} %	% d.Theorie
Peakhöhe	1,74	98,9	0,78	101,2
elektronische Integration	1,66	99,4	0,59	101,0
Peakhöhe x Halbwertsbreite	2,29	100,4	2,42	101,0
Peakhöhe x Gesamtretentionszeit	1,69	98,8	0,85	101,1
Condall-Bosch	2,93	96,8	3,30	96,8

7.5. Quantitative Bestimmung von Salicylamid, Acetophenetidin und Coffein

Interner Standard : Gluthetimid
 Mobile Phase : Dioxan (9,9), Eisessig (1,1),
 n-Hexan (89) v/v
 Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
 Druck : keine Manometeranzeige
 Einspritzmenge : 6 µl; Analysendauer: 8 1/2 min
 Spezialität : Melabon Kopfschmerztabletten[®] (Oramon)
 Korrekturfaktor : aus 12 Messungen
 Anzahl der Analysen : 11

Einwaage:

Salicylamid : 202,0 mg
 Acetophenetidin : 30,0 mg
 Coffein : 73,6 mg
 Standard : 400,0 mg / 15 ml Dioxan + 20 ml Eluens

Ergebnis : Tabelle 22 :

Auswerteverfahren	Salicylamid			Acetophenetidin			Coffein		
	s _{rel}	%	% d.Th.	s _{rel}	%	% d.Th.	s _{rel}	%	% d.Th.
Peakhöhe	0,51		100,2	1,32		100,5	0,80		100,3
elektronische Integration	0,88		100,9	1,98		100,0	2,88		98,8
Peakhöhe x Halbwertsbreite	1,49		99,6	2,70		100,6	1,74		98,9
Peakhöhe x Gesamtretentionszeit	0,72		100,3	1,62		100,6	1,80		99,6
Condall-Bosch	1,16		100,2	2,01		100,6	1,82		99,3

7.6. Quantitative Bestimmung von Acetylsalicylsäure,
Acetophenetidin und Coffein

Interner Standard : Phenytoin
Mobile Phase : Dioxan (9,9), Eisessig (1,1),
n-Hexan (89) v/v
Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
Druck : keine Manometeranzeige
Einspritzmenge : 6 µl; Analysendauer: 8 1/2 min
Spezialität : Thomapyrin[®] (Thomae)
Neuralgin[®] (Pfleger)
Gepan[®] (Pohl-Boskamp)
Korrekturfaktor : aus 12 Messungen
Anzahl der Analysen : 11

Einwaage: : s. nächste Seite

Ergebnis : Tabelle 23 :

Auswerteverfahren	Acetylsalicylsäure		Acetophenetidin		Coffein	
	s _{rel}	% d.Th.	s _{rel}	% d.Th.	s _{rel}	% d.Th.
Peakhöhe	0,85	99,6	1,18	100,0	3,13	100,5
elektronische Integration	1,89	99,6	2,12	100,7	2,63	100,5
Peakhöhe x Halbwertsbreite	2,40	99,8	2,38	100,4	2,35	101,2
Peakhöhe x Gesamtretentionszeit	1,30	100,7	1,35	99,9	3,79	100,3
Condall-Bosch	1,85	100,6	1,48	100,0	3,56	103,1

Tabelle 24 : Beispiel für die Fehlerrechnung nach Nalimov

Standard Lösung: 251,4 mg Acetylsalicylsäure

31,3 mg Acetophenetidin

70,0 mg Coffein

325,0 mg Phenytoin / 20 ml Dioxan und 10 ml Eluens

Anzahl d. Messungen: 12

Peak Standard	Peak Subst.1	Korrektur Faktor1	Peak Subst.2	Korrektur Faktor2	Peak Subst.3	Korrektur Faktor3
10,82	11,80	0,7093	12,20	0,0854	4,70	0,4958
14,51	15,70	0,7149	16,50	0,0847	6,50	0,4808
14,15	15,51	0,7057	15,90	0,0857	6,20	0,4916
13,90	15,40	0,6982	15,80	0,0847	6,28	0,4767
14,00	15,10	0,7172	15,85	0,0851	6,30	0,4786
14,48	15,85	0,7067	16,30	0,0856	6,50	0,4798
14,40	15,80	0,7050	16,00	0,0867	6,35	0,4884
14,60	16,10	0,7015	16,20	0,0868	6,50	0,4838
14,70	16,00	0,7107	16,20	0,0874	6,40	0,4947
14,58	16,00	0,7049	16,18	0,0868	6,08	0,5165
14,40	16,10	0,6919	16,25	0,0853	6,40	0,4846
13,80	15,40	0,6932	15,40	0,0863	5,90	0,5038

Standardkorrekturfaktor 1 : 0,7049

Abweichungen nach Nalimov :

0,585	1,334	0,106	-0,899	1,639	0,235	0,010	-0,461
0,771	-0,004	-1,745	-1,570				

s: 0,008

$s_{rel} \cdot 1,11 \%$

Standardkorrekturfaktor 2 : 0,0859

Abweichungen n. Nalimov :

-0,534	-1,377	-0,191	-1,337	-0,940	-0,370	0,941
1,080	1,775	1,067	-0,616	0,503		

s: 0,001

s rel.: 1,04 %

Standardkorrekturfaktor 3 : 0,4896

Abweichungen n. Nalimov :

0,556	-0,783	0,175	-1,147	-0,977	-0,872	-0,104	-0,518
0,455	2,396	-0,444	1,263				

s: 0,012

s rel.: 2,40 %

1. Neuberechnung:

Standardkorrekturfaktor 3 : 0,4872

Abweichungen n. Nalimov :

1,071	-0,783	0,544	-1,286	-1,051	-0,906	0,157	-0,415
0,932	-0,313	2,050					

s: 0,009

s rel.: 1,75 %

2. Neuberechnung:

Standardkorrekturfaktor 3 : 0,4855

Abweichungen n. Nalimov :

1,598	-0,724	0,937	-1,353	-1,059	-0,877	0,454	-0,263
1,423	-0,135						

s: 0,007

s rel.: 1,41 %

Bei der Berechnung der Standardkorrekturfaktoren eins und zwei treten keine Ausreißer auf.

Bei den Abweichungen nach Nalimov (r^* -Werte) zeigt sich, daß beim Standardkorrekturfaktor drei der größte Wert (2,396) bei $f = 10$ ($n = 12 - 2$) signifikant als Ausreißer zu betrachten ist. Er wird deshalb entfernt. Die größte Abweichung (2,050) der ersten Neuberechnung ist bei $f = 9$ ($n = 11 - 2$) wahrscheinlich ein Ausreißer. In der zweiten Neuberechnung sind keine Ausreißer mehr enthalten.

Tabelle 25 :

Analysen Lösung: s. Standardlösung

Anzahl d. Messungen: 11

Peak Standard	Peak Subst.1	mg Subst.1	Peak Subst.2	mg Subst.2	Peak Subst.3	mg Subst.3
14,20	15,48	249,743	16,00	31,456	6,40	71,114
14,00	15,15	247,911	15,80	31,507	6,40	72,130
14,40	15,90	252,956	15,95	30,923	5,98	65,525
14,40	15,65	248,979	16,30	31,601	6,40	70,127
14,85	15,96	246,217	16,70	31,395	6,30	66,939
14,80	16,12	249,525	17,00	32,067	6,70	71,430
14,50	15,90	251,212	16,20	31,191	6,50	70,731
14,40	15,80	251,365	16,10	31,213	6,50	71,222
14,00	15,48	253,311	15,50	30,909	6,40	72,130
14,80	16,20	250,763	16,45	31,030	6,80	72,496
14,85	16,30	251,462	16,40	30,831	6,60	70,127

Gehalt an Acetylsalicylsäure: 250,31 mg (= 99,6 % d.Th.)

$$s_{rel_1} = 0,85 \%$$

Gehalt an Acetophenetidin: 31,28 mg (= 100,0 % d.Th.)

$$s_{rel_2} = 1,18 \%$$

Gehalt an Coffein: 70,36 mg (= 100,5 % d.Th.)

$$s_{rel_3} = 3,13 \%$$

7.7. Vergleich der Auswerteverfahren

Zugrunde gelegt wird die jeweilige relative Standardabweichung:

Tabelle 26 :

Substanz	Peak- höhe	elektr. Integra- tion	Höhe x Halbwerts- breite	Höhe x Gesamt- retent.	Condall- Bosch
Phenylbutazon	0,97	1,05	1,29	1,27	1,64
Acetylsalicyl- säure	0,39	0,80	1,04	0,71	1,56
Acetophenetidin	0,56	0,80	1,13	0,50	0,96
Phenylbutazon	1,74	1,66	2,29	1,69	2,93
Propyphenazon	0,78	0,59	2,42	0,85	3,30
Salicylamid	0,51	0,88	1,49	0,72	1,16
Acetophenetidin	1,32	1,98	2,70	1,62	2,01
Coffein	0,80	2,88	1,74	1,80	1,82
Acetylsalicyl- säure	0,85	1,89	2,40	1,30	1,85
Acetophenetidin	1,18	2,12	2,38	1,35	1,48
Coffein	3,13	2,63	2,35	3,79	3,56
	$\bar{x}=1,11$	$\bar{x}=1,57$	$\bar{x}=1,93$	$\bar{x}=1,42$	$\bar{x}=2,03$

Die größte Genauigkeit wird bei der Auswertung über die Peakhöhe erreicht, danach folgen fast gleich die Peakhöhe x Gesamtretentionszeit und die elektronische Integration und zum Schluß die Peakhöhe x Halbwertsbreite und Condall-Bosch.

Die weiteren Analysen wurden entweder über die Peakhöhe oder die elektronische Integration als wenig zeitaufwendiges Verfahren ausgewertet.

7.8. Quantitative Bestimmung von Acetylsalicylsäure und
Coffein im Verhältnis 10:1

Interner Standard : Phenazon
Mobile Phase : Dioxan (18), Eisessig (2),
n-Hexan (80) v/v
Strömungsgeschw. : 1,1 ml / min; T = 22° C
Druck : keine Manometeranzeige
Einspritzmenge : 5 µl; Analysendauer: 6 min
Auswertung : Peakhöhe
Spezialität : Cafaspin® (Bayer)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 11
Wellenlänge : 273 nm

Einwaage:

Acetylsalicylsäure : 500,0 mg
Coffein : 50,0 mg
Standard : 120 mg / 15 ml Dioxan + 35 ml Hexan
(dann 1:10 verdünnt)

Ergebnis

Acetylsalicylsäure : 495 mg (= 99,0 % d. Theorie)
s_{rel} : 0,81 %
Coffein : 49,82 mg (= 99,7 % d.Theorie)
s_{rel} : 1,15 %

7.9. Quantitative Bestimmung von Cafaspin[®] Tabletten

Interner Standard : Acetophenetidin
Stationäre Phase : SIL X I
Mobile Phase : Dioxan (33,75), Eisessig (3,75),
n-Hexan (62,5) v/v
Strömungsgeschw. : 0,85 ml / min; T = 50° C
Druck : 100 PSI
Einspritzmenge : 4 µl; Analysendauer: 10 min
Auswertung : Peakhöhe
Spezialität : 500-er Originalpackung
Korrekturfaktor : wurde vor jeder zweiten Analyse
neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 10
Wellenlänge : 273 nm

Probenzubereitung:

Die Analysenlösung wurde so hergestellt, daß jeweils eine Cafaspintablette in 20 ml Dioxan gegeben wurde. Zum schnelleren und besseren Lösen der Inhaltsstoffe wurde dann der Jodzahlkolben unter öfterem leichtem Umschütteln eine halbe Stunde in ein Wasserbad von 36° C gestellt. Danach wurden noch 5,00 ml Dioxan, in denen 20 mg Standard gelöst waren, und 25 ml Hexan zugegeben. Die Tablettenhilfsstoffe wurden nicht abfiltriert.

Beim Acetylsalicylsäurepeak wurde bei Erreichen der Basislinie die Empfindlichkeit des Schreibers von 100 mV auf 1 V umgestellt, da dieser Peak sonst nicht mehr auf die Schreiberbreite gepaßt hätte.

Tabelle 27 : gefundene Werte

mg Acetylsalicylsäure	mg Coffein
505,22	51,06
494,43	51,03
511,33	52,92
501,49	50,30
501,74	50,21
501,74	49,10
505,12	51,34
496,16	53,84
498,82	50,26
498,54	50,63

Ergebnis:

Acetylsalicylsäure: 501,46 mg (= 100,3 % d.Th.)

s_{rel} : 0,98 %

Coffein : 51,07 mg (= 102,1 % d.Th.)

s_{rel} : 2,71 %

7.9.1. Vergleich zur quant. in situ-Auswertung in der DC:

Obiges Problem wurde auch von Ebel und Herold ³²⁴⁾ dünn-schichtchromatographisch quantitativ durch in situ Remissionsanalyse bearbeitet. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

Acetylsalicylsäure: 506,70 mg (= 101,3 % d.Th.)

s_{rel} : 3,8 %

Coffein : 50,75 mg (= 101,6 % d.Th.)

s_{rel} : 5,1 %

Sowohl in der Genauigkeit als auch in der Analysendauer dürfte die quantitative HPLC die DC übertreffen.

7.10. Quantitative Bestimmung von Neuralgin[®] Tabletten

Interner Standard : Phenytoin
Stationäre Phase : SIL X II
Mobile Phase : Dioxan (9,9), Eisessig (1,1),
n-Hexan (89) v/v
Strömungsgeschw. : 0,9 ml / min; T = 22° C
Druck : keine Manometeranzeige
Einspritzmenge : 4 µl; Analysendauer: 9 min
Auswertung : Peakhöhe
Spezialität : XX-er Originalpackung
Korrekturfaktor : wurde nach jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 9
Wellenlänge : 260 nm

Probenzubereitung: s. Nr. 7.9.

Ergebnis:

Acetylsalicylsäure : 247,77 mg (= 99,1 % d.Th.)
s_{rel} : 1,63 %
Acetophenetidin : 198,31 mg (= 99,2 % d.Th.)
s_{rel} : 1,97 %
Coffein : 50,91 mg (= 101,8 % d.Th.)
s_{rel} : 3,48 %

Beim Acetophenetidinpeak wurde bei Erreichen der Basislinie die Empfindlichkeit des Schreibers von 100 mV auf 1 V umgeschaltet, da dieser Peak sonst nicht mehr auf die Schreiberbreite gepaßt hätte.

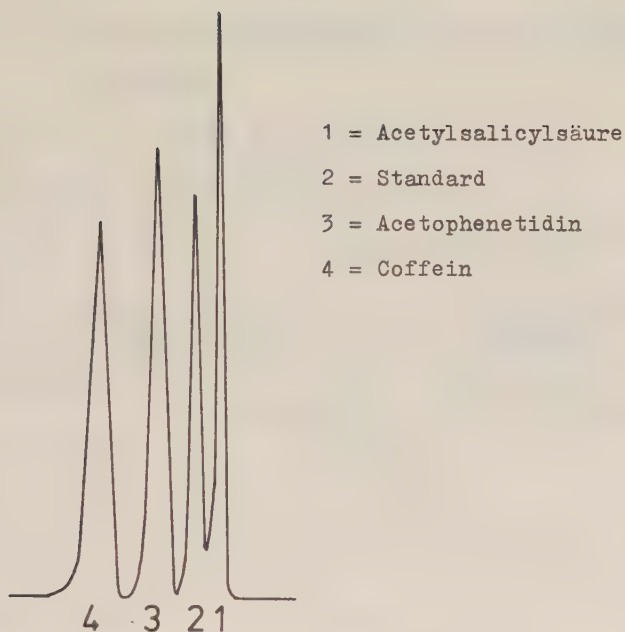
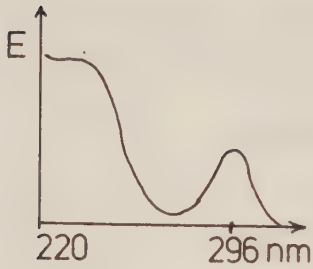
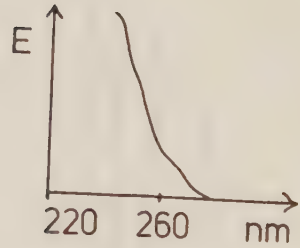


Abb. 9

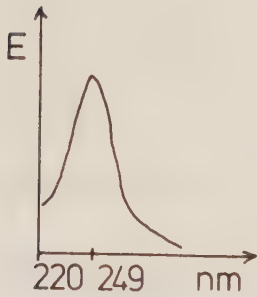
Ein Vermessen der Analyse im Absorptionsmaximum der Substanz, die konzentrationsmäßig am geringsten vorhanden ist (Coffein, $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$) war nicht möglich, da die geringe Extinktion des Standards bei dieser Wellenlänge zu hohen Einwaagen desselben geführt hätte. Bei 260 nm ließen sich sowohl der Standard als auch das Coffein gut chromatographieren (UV-Spektren s. Abb. 10).



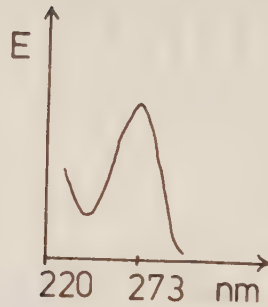
Acetylsalicylsäure



Phenytoin



Acetophenetidin



Coffein

Abb. 10 : UV-Spektren

7.11. Quantitative Bestimmung von Melabon[®] Kopfschmerz-
tabletten

Interner Standard : Nitrazepam
Stationäre Phase : SIL X II
Mobile Phase : Dioxan (10,8), Eisessig (1,2),
n-Hexan (88) v/v
Strömungsgeschw. : 0,8 ml / min; T = 22° C
Druck : keine Manometeranzeige
Einspritzmenge : 3 µl; Analysendauer: 10 min
Auswertung : Peakhöhe
Spezialität : 2-er Proben
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 14
Wellenlänge : 273 nm

Probenzubereitung : s. Nr. 7.9.

Ergebnis:

Salicylamid : 195,95 mg (= 98,0 % d.Th.)
s_{rel} : 2,93 %
Acetophenetidin : 290,13 mg (= 96,7 % d.Th.)
s_{rel} : 1,78 %
Coffein : 46,00 mg (= 92,0 % d.Th.)
s_{rel} : 3,03 %

Da die Abweichungen vom theoretischen Sollwert sehr groß sind, wurden am nächsten Tag dieselben Tablettenlösungen mit einer SILX I Säule noch einmal untersucht. Hierbei wurden entsprechende Werte gefunden. Die Vermutung liegt nahe, daß obige Tabletten aus einer Fehlcharge stammen, und deshalb als Proben abgegeben worden sind.

8. Quantitative Reverse-Phase Chromatographie

LC-Gerät : Perkin-Elmer 1220
Trennsäule : V4A-Stahl, Länge: 25 cm,
Innendurchmesser: 2,6 mm
Stationäre Phase : Kieselgel C-8, 8 μ (von Merck)
Wellenlänge : 254 nm

8.1. Quantitative Bestimmung von Paracetamol und Phenylbutazon

Interner Standard : p-Hydroxibenzoesäuremethylester
Mobile Phase : Acetonitril (40), Wasser (60) v/v
Strömungsgeschw. : 0,8 ml /min; T = 22° C
Druck : 1000 PSI
Einspritzmenge : 2,5 μ l ; Analysendauer: 9 min
Auswertung : Peakhöhe
Spezialität : Oluprin[®] (Geigy)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 9

Einwaage

Paracetamol : 25,0 mg
Phenylbutazon : 142,0 mg
Standard : 33,5 mg / 18 ml Acetonitril + 22 ml Wasser

Ergebnis

Paracetamol : 25,03 mg (= 100,1 % d.Th.)
s_{rel} : 0,47 %
Phenylbutazon : 141,00 mg (= 99,3 % d.Th.)
s_{rel} : 0,97 %

8.2. Quantitative Bestimmung von Citronensäure, Coffein
und Phenazon

Interner Standard : Sulfamerazin
Mobile Phase : Acetonitril (20), Wasser (80) v/v
Strömungsgeschw. : 0,75 ml /min; T = 20° C
Druck : 1080 PSI
Einspritzmenge : 2 µl; Analysendauer: 9 min
Auswertung : elektronische Integration
Spezialität : Migränin[®] (Hoechst)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 11

Einwaage:

Citronensäure : 90,9 mg
Coffein : 59,6 mg
Phenazon : 89,4 mg

Standard : 36,3 mg/ 15 ml Acetonitril + 25 ml Wasser

Ergebnis:

Citronensäure : 90,02 mg (= 99,0 % d.Th.)
s_{rel} : 2,13 %
Coffein : 59,66 mg (= 100,1 % d.Th.)
s_{rel} : 0,64 %
Phenazon : 90,15 mg (= 100,8 % d.Th.)
s_{rel} : 1,07 %

8.3. Quantitative Bestimmung von Coffein, Acetophenetidin und Aminophenazon

Interner Standard : p-Hydroxibenzoesäurepropylester
Mobile Phase : Acetonitril (50), Wasser (50) v/v
Strömungsgeschw. : 0,75 ml / min; T = 30° C
Druck : 820 PSI
Einspritzmenge : 2 µl; Analysendauer: 13 min
Auswertung : elektronische Integration
Spezialität : Caprin[®] (Caprin GmbH, Bad Homburg)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 11

Einwaage:

Coffein : 30,0 mg
Acetophenetidin : 13,0 mg
Aminophenazon : 120,0 mg
Standard : 14,0 mg / 20 ml Acetonitril + 20 ml H₂O

Ergebnis:

Coffein : 30,07 mg (= 100,2 % d.Th.)
s_{rel} : 0,77 %
Acetophenetidin : 12,99 mg (= 99,9 % d.Th.)
s_{rel} : 0,39 %
Aminophenazon : 120,68 mg (= 100,6 % d.Th.)
s_{rel} : 3,21 %

Die relativ hohe Standardabweichung von Aminophenazon erklärt sich aus einem substanzspezifischem breiten Peak mit Tailing. Dieses verhindert die Ausbildung eines scharfen, schmalen und gut reproduzierbaren Peaks.

8.4. Quantitative Bestimmung von Coffein, Phenazon,
Lactophenin und Acetophenetidin

Interner Standard : Sulfamerazon
Mobile Phase : Acetonitril (20), Wasser (80) v/v
Strömungsgeschw. : 0,75 ml / min; T = 22° C
Druck : 1100 PSI
Einspritzmenge : 2 µl; Analysendauer: 12 min
Auswertung : elektronische Integration
Spezialität : Quadronal [®] (Asta)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 7

Einwaage:

Coffein : 50,6 mg
Phenazon : 85,8 mg
Lactophenin : 13,3 mg
Acetophenetidin : 34,8 mg
Standard : 34,9 mg / 10 ml Acetonitril + 30 ml Wasser

Ergebnis:

Coffein : 50,69 mg (= 100,2 % d.Th.)
s_{rel} : 0,63 %
Phenazon : 85,44 mg (= 99,6 % d.Th.)
s_{rel} : 1,48 %
Lactophenin : 13,24 mg (= 99,6 % d.Th.)
s_{rel} : 2,48 %
Acetophenetidin : 34,61 mg (= 99,5 % d.Th.)
s_{rel} : 1,62 %

8.5. Quantitative Bestimmung von Metamizol und Aminophenazon

Interner Standard : Salicylamid
Mobile Phase : Acetonitril (56), Wasser (44) v/v
Strömungsgeschw. : 0,75 ml / min; T = 41° C
Druck : 680 PSI
Einspritzmenge : 4 µl; Analysendauer: 5 min
Auswertung : elektronische Integration
Spezialität : Gardan[®] (Hoechst)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 12

Einwaage:

Metamizol : 11,0 mg
Aminophenazon : 30,0 mg
Standard : 31,0 mg / 15 ml Acetonitril + 15 ml Wasser

Ergebnis:

Metamizol : 11,0 mg (= 100,0 % d.Th.)
s_{rel} : 1,54 %
Aminophenazon : 30,08 mg (= 100,3 % d.Th.)
s_{rel} : 1,74 %

8.6. Quantitative Bestimmung von Coffein, Acetophenetidin
und Salicylamid

Interner Standard : Dulcin
Mobile Phase : Acetonitril (25), Wasser (75) v/v
Strömungsgeschw. : 0,75 ml / min; T = 22° C
Druck : 1110 PSI
Einspritzmenge : 3 µl; Analysendauer: 8 min
Auswertung : Peakhöhe
Spezialität : Melabon[®] Kopfschmerztabletten (Oramon)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 10

Chromatogramm

1 = Coffein
2 = Salicylamid
3 = Standard
4 = Acetophenetidin



Abb. 11

Einwaage:

Coffein : 20,0 mg
Salicylamid : 40,0 mg
Acetophenetidin : 13,0 mg
Standard : 25,0 mg / 7,5 ml Acetonitril +
22,5 ml Wasser

Tabelle 28 : gefundene Werte

mg Substanz 1	mg Substanz 2	mg Substanz 3
20,11	40,69	13,10
20,02	40,02	12,85
19,95	39,95	12,95
19,90	39,58	12,92
20,09	40,32	13,04
19,91	39,92	12,86
19,95	40,22	13,02
19,95	40,09	12,99
20,11	39,99	12,89
19,99	39,95	13,00

Ergebnis:

Coffein : 20,00 mg (= 100,0 % d.Th.)
s_{rel} : 0,40 %
Salicylamid : 40,07 mg (= 100,2 % d.Th.)
s_{rel} : 0,73 %
Acetophenetidin : 12,96 mg (= 99,7 % d.Th.)
s_{rel} : 0,64 %

8.7. Quantitative Bestimmung von Acetylsalicylsäure,
Paracetamol und Coffein

Interner Standard : Sulfaguanidin
Mobile Phase : Acetonitril (10), Wasser (90) v/v
Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
Druck : 1500 PSI
Einspritzmenge : 3 µl ; Analysendauer: 6 min
Auswertung : elektronische Integration
Spezialität : Thomapyrin N[®] (Thomae)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 11



Chromatogramm

1 = Acetylsalicylsäure
2 = Standard
3 = Paracetamol
4 = Coffein

8.8. Quantitative Bestimmung von Coffein, Phenazon,
Acetophenetidin und Aminophenazon

Interner Standard : Acetanilid
Mobile Phase : Acetonitril (20), Wasser (80) v/v
Strömungsgeschw. : 0,75 ml / min; T = 22° C
Druck : 1100 PSI
Einspritzmenge : 5 µl; Analysendauer: 12 min
Auswertung : Peakhöhe
Spezialität : Eu-med [®] (MED)
Korrekturfaktor : wurde vor jeder Analyse neu bestimmt
Anzahl der Analysen : 9

Einwaage:

Coffein : 40,0 mg
Phenazon : 50,0 mg
Acetophenetidin : 60,0 mg
Aminophenazon : 30,0 mg
Standard : 40,0 mg / 6 ml Acetonitril + 24 ml Wasser

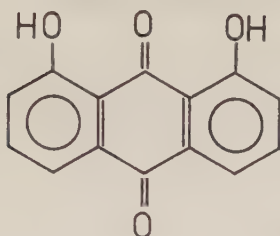
Tabelle 30 : gefundene Werte

mg Substanz 1	mg Substanz 2	mg Substanz 3	mg Substanz 4
40,13	49,63	59,63	30,29
39,84	49,88	60,85	30,00
39,90	50,63	61,42	29,93
39,69	50,34	61,14	30,03
39,86	50,58	59,40	29,94
39,98	50,02	59,52	29,87
40,12	50,09	59,35	30,13
39,66	49,72	59,16	29,96
39,71	49,78	59,79	29,80

Ergebnis:

Coffein	:	39,88 mg (= 99,7 % d.Th.)
		s_{rel} : 0,44 %
Phenazon	:	50,07 mg (= 100,2 % d.Th.)
		s_{rel} : 0,74 %
Acetophenetidin	:	60,03 mg (= 100,1 % d.Th.)
		s_{rel} : 1,44 %
Aminophenazon	:	30,00 mg (= 100,0 % d.Th.)
		s_{rel} : 0,48 %

9. Bestimmung der Reproduzierbarkeit im Nanogrammbereich



Danthron

Es wurde eine Lösung aus Danthron (Analyse) und Acetanilid (Standard) hergestellt und jeweils der Korrekturfaktor berechnet. Aus der relativen Standardabweichung ergibt sich die Genauigkeit.

Interner Standard : Acetanilid
Stationäre Phase : SIL X II
Mobile Phase : Dioxan (10,8), Eisessig (1,2),
n-Hexan (88) v/v
Strömungsgeschw. : 1 ml / min; T = 22° C
Druck : keine Manometeranzeige
Einspritzmenge : 1; 2; 3 µl; Analysendauer: 3 min
Auswertung : Peakhöhe
Anzahl der Messungen: 13
Probenherstellung : 50 mg Danthron in 250 ml Eluens,
dann 1:10 verdünnt
Wellenlänge ($\lambda_{\max}$) : 252 nm (Bestimmung mit dem Beckmann-
UV Gerät)

Ergebnis:

bei 20 ng Säulenaufgabe s_{rel} : 6,57 %
bei 40 ng " s_{rel} : 4,70 %
bei 60 ng " s_{rel} : 1,79 %

Um sehr geringe Substanzmengen nachzuweisen, müssen diese:

- a) einen großen Extinktionskoeffizienten haben,
- b) im Maximum vermessen werden,
- c) zuerst im Chromatogramm als scharfer Peak kommen,
- d) bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten bestimmt werden, da

$$A = K \frac{c}{v}$$

A = Peakfläche

K = UV-Eichfaktor

c = Konzentration der Analysenkomponente in der mobilen Phase

v = Strömungsgeschwindigkeit

9.1. Bestimmung der spezifischen Extinktion von Danthron

Die spezifische Extinktion ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) wird nach DAB 7 auf eine 1%ige Lösung mit einer Schichtdicke von 1 cm bezogen.

$$\frac{E_{1\text{cm}}^{1\%}}{1\text{ cm}} = \frac{E}{c \cdot d}$$

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = spezifischer Extinktionskoeffizient

E = gemessene Extinktion

c = Konzentration in g / 100 ml

d = Schichtdicke in cm

Es wurden 10 mg Danthron in 100 ml Eluens gelöst und dann 1:10 verdünnt. Am Zeiss Gerät PM2A betrug bei 252 nm die Extinktion 0,31. Daraus errechnet sich ein spezifischer Extinktionskoeffizient von $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 310$.

10. Schlußbetrachtung

Mit dieser Arbeit wird demonstriert, daß die Hochdruck-flüssigchromatographie bei Verwendung eines Hochdruckflüssigchromatographen mit Langhubkolbenpumpen gut in der pharmazeutischen Analytik eingesetzt werden kann. Es sollen weder die GC noch die DC verdrängt werden, denn die HPLC stellt eine sinnvolle und praktische Erweiterung der chromatographischen Untersuchungsmethoden dar. Der große Vorteil gegenüber der GC liegt darin, daß die Substanzen nicht mehr thermostabil zu sein brauchen, gegenüber der DC ist die Schnelligkeit der qualitativen Trennungen und der quantitativen Bestimmungen auch bei Substanzgemischen und Tabletten, bei denen Hilfsstoffe nicht abgetrennt zu werden brauchen, hervorzuheben. Aus den angegebenen Literaturstellen ist ersichtlich, daß das Anwendungsgebiet noch wesentlich größer als Pharmazie ist und daß die Methode in fast allen Bereichen verwendet werden kann. Sie dürfte ihren festen Platz in der Routine- und Qualitätskontrolle sowohl bei qualitativen als auch bei quantitativen Analysen haben, ist allerdings weniger dazu geeignet, kurzfristige Probleme schnell zu lösen, da bei jeder Einstellungsänderung sowohl bei Erfassung des Grundproblems als auch beim Optimieren oder bei Lösungsmittelumstellungen das System wegen seiner Trägheit relativ viel Zeit benötigt, um wieder konstant und reproduzierbar zu arbeiten.

Bei der Verwendung eines mittels Rechner automatisch gesteuerten Dosier- und Registriersystems läßt sich der benötigte Zeitaufwand noch wesentlich reduzieren.

Zur Erhöhung der Selektivität ist es notwendig, das Angebot an Säulenfüllmaterialien noch zu vergrößern und weitere Detektionsmöglichkeiten neben UV und IR zur allgemeinen Laborverwendung serienreif auszubauen, damit alle Anwendungsmöglichkeiten der HPLC optimal genutzt werden können.

Zeichenerklärung

t_R	=	Gesamtretentionszeit
t'_R	=	Nettoretentionszeit
t_0	=	Totzeit
II	=	Absolutbetrag
f_{St}	=	Interner Standard
$\bar{x}$	=	Mittelwert
x	=	einzelner Meßwert
s	=	Standardabweichung
s_{rel}	=	relative Standardabweichung

Literaturverzeichnis

- 1) E. Ecker, Chemiker-Ztg. 95, 511 (1971)
- 2) E. Heftmann, J. Chromatog. Sci. 11, 295 (1973)
- 3) D.M. Heinekey, Proc. Soc. Analyt. Chem. 11, (1972)
- 4) W.P. Taggart, Ind. Res. 76, (1974)
- 5) Waters Ass. Inc. Firmenprospekt AN 71-114
- 6) H.M. McNair, Chromatographia 7, 161 (1974)
- 7) J.H. Knox, Lab. Equipm. Digest 12, No. 11, 51-64 (1974)
- 8) J.F.K. Huber, Z. Anal. Chem. 277, 341 (1975)
- 9) M. Martin, C. Eon und G. Guiochon,
J. Chromatogr. 99, 357 (1974)
- 10) M. Martin, C. Eon und G. Guiochon,
J. Chromatogr. 110, 213 (1975)
- 11) H. Wiedemann, H. Engelhardt und I. Halász,
J. Chromatogr. 91, 141-150 (1974)
- 12) R.W. Frei und W. Santi, Z. Anal. Chem. 227, 303 (1975)
- 13) Jobling, Lab. Equipm. Digest 12, No. 11, 94 (1974)
- 14) G.H.R. Rao und M.W. Anders,
J. Chromatogr. 84, 402-406 (1973)
- 15) R.C. Garner, J. Chromatogr. 103, 186 (1975)
- 16) J.N. Seiber und D.P.H. Hsieh, J. Assoc. Offic.
Anal. Chemists 56, 827 (1973)
- 17) R.A. Heacock, K.R. Langille, J.D. MacNeil und R.W. Frei,
J. Chromatogr. 77, 425-430 (1973)
- 18) G.H. Jolliffe und E.J. Shellard, J. Chromatogr. 81,
150-151 (1973)
- 19) J.H. Knox und J. Jurand, J. Chromatogr. 82, 398-401 (1973)
- 20) R. Verpoorte und A.B. Svendsen,
J. Chromatogr. 109, 441 (1975)

- 21) R. Verpoorte und A.B. Svendsen,
J. Chromatogr. 100, 227 (1974)
- 22) R. Verpoorte und A.B. Svendsen,
J. Chromatogr. 100, 231 (1974)
- 23) R.N. Smith, J. Chromatogr. 115, 101 (1975)
- 24) K. Callmer, J. Chromatogr. 115, 397 (1975)
- 25) E. Stahl, E. Laub und R. Woller,
Z. Anal. Chem. 275, 257 (1975)
- 26) G.P. Belue, J. Chromatogr. 100, 233 (1974)
- 27) D. Lairon, J. Amic, H. Lafont, G. Nalbone, N. Domingo
und J. Hauton, J. Chromatogr. 88, 183 (1974)
- 28) G.B. Cox, J. Chromatogr. 83, 471-481 (1973)
- 29) R.B. Sleight, Chromatographia 6, 3 (1973)
- 30) G. Helmchen und W. Strubert, Chromatographia 7,
713-715 (1974)
- 31) H.-J. Klimisch und L. Stadler,
J. Chromatogr. 90, 141-148 (1974)
- 32) D. Kunzru und R.W. Frei, J. Chromatogr. Sci. 12,
191-196 (1974)
- 33) B.-A. Persson und B.L. Karger,
J. Chromatogr. Sci. 12, 521-528 (1974)
- 34) E. Röder und J. Merzhäuser,
Z. Anal. Chem. 272, 34-37 (1974)
- 35) K. Samejima, J. Chromatogr. 96, 250-254 (1974)
- 36) B. Uchytíl, J. Chromatogr. 93, 447-455 (1974)
- 37) D.J. Evans, R.J. Mayfield und I.M. Russel,
J. Chromatogr. 115, 391 (1975)
- 38) T. Sugiura, T. Hayashi, S. Kawai und T. Ohno,
J. Chromatogr. 110, 385 (1975)
- 39) M.M. Abdel-Monem und K. Ohno,
J. Chromatogr. 107, 416 (1975)

- 40) H.R. Gutmann, D. Malejka-Giganti und R. Melver,
J. Chromatogr. 115, 71 (1975)
- 41) W.T. Iwaoka, T. Hansen, S.-T. Hsieh und M.C. Archer,
J. Chromatogr. 103, 349 (1975)
- 42) G. Frank und W. Strubert, Chromatographia 6, 522 (1973)
- 43) H.-W. Lange, N. Lustenberger und K. Hempel,
Z. Anal. Chem. 261, 337 - 342 (1973)
- 44) A. Haag und K. Langer, Chromatographia 7, 659-662 (1974)
- 45) W. Voelter und K. Zech, J. Chromatogr. 112, 643 (1975)
- 46) A.P. Graffeo, A. Haag und B.L. Karger,
Anal. Letters 6, 505 (1973)
- 47) L.L. Needham und M.M. Kochhar,
J. Chromatogr. 114, 220 (1975)
- 48) J.H. Knox und J. Jurand, J. Chromatogr. 110, 103 (1975)
- 49) K. Tsuji und J.H. Robertson, J. Chromatogr. 112, 663 (1975)
- 50) W.J. Rzeszutarski und A.B. Mauger,
Chromatogr. 86, 246 (1973)
- 51) R.P. Buhs, T.E. Maxim, N. Allen, T.A. Jacob und
F.J. Wolf, J. Chromatogr. 99, 609 (1974)
- 52) K. Tsuji, J.H. Robertson und J.A. Bach,
J. Chromatogr. 99, 597 (1974)
- 53) K. Tsuji und J.H. Robertson,
J. Chromatogr. 94, 245-253 (1974)
- 54) W. Mechlinski und C.P. Schaffner,
J. Chromatogr. 99, 619 (1974)
- 55) Gy Vigh und J. Inczédy, J. Chromatogr. 102, 381 (1974)
- 56) W. Düniges, G. Naundorf und N. Seiler,
J. Chromatog. Sci. 12, 655-657 (1974)
- 57) J. Aurenge, J. Chromatogr. 84, 285-298 (1973)
- 58) W. Hövermann, A. Rapp und A. Ziegler,
Chromatographia 6, 317 (1973)

- 59) W. Funasaka, T. Hanai und K. Fujimura,
J. Chromatog. Sci. 12, 517-520 (1974)
- 60) K.-G. Wahlund, J. Chromatogr. 115, 411 (1975)
- 61) H. Hyakutake und T. Hanai, J. Chromatogr. 108, 385 (1975)
- 62) M. Richards, J. Chromatogr. 115, 259 (1975)
- 63) J.C. Kraak und J.F.K. Huber,
J. Chromatogr. 102, 333 (1974)
- 64) E. Grushka, H.D. Durst und E.J. Kikta, jr.,
J. Chromatogr. 112, 673 (1975)
- 65) L. Olsson und O. Samuelson, J. Chromatogr. 106, 139 (1975)
- 66) N. Evans, D.E. Games, A.H. Jackson und S.A. Matlin,
J. Chromatogr. 115, 325 (1975)
- 67) R.W. Dalton, C.D. Chandler und W.T. Bolleter,
J. Chromatog. Sci. 13, 40 (1975)
- 68) J.O. Doali und A.A. Juhasz, J. Chromatog. Sci. 12, 51 (1974)
- 69) K. Aitzetmüller, J. Chromatog. Sci. 13, 454 (1975)
- 70) K. Aitzetmüller, Fette-Seifen-Anstrichmittel 75, 14 (1973)
- 71) K. Aitzetmüller, Fette-Seifen-Anstrichmittel 75, 256 (1973)
- 72) K. Aitzetmüller, J. Chromatogr. 83, 461-469 (1973)
- 73) M.J. Cooper und M.W. Anders,
J. Chromatog. Sci. 13, 407 (1975)
- 74) K. Kiuchi, T. Ohta und H. Ebine,
J. Chromatog. Sci. 13, 461 (1975)
- 75) R. Fischer, Chromatographia 7, 207-210 (1974)
- 76) K. Kiuchi, T. Ohta und H. Ebine,
J. Chromatog. Sci. 13, 461 (1975)
- 77) K. Aitzetmüller und G. Guhr,
Fette-Seifen-Anstrichmittel 78, 83 (1976)
- 78) F.J. Evans, J. Chromatogr. 88, 411-412 (1974)
- 79) M.C. Castle, J. Chromatogr. 115, 437 (1975)

- 80) G. Gauchel, F.D. Gauchel und L. Birkofer,
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 35 (1973)
- 81) R.W. Frei, K. Beall und R.M. Cassidy,
Mikrochim. Acta 859, 1974
- 82) W. Wildanger, Chromatographia 8, 42 (1975)
- 83) C. Gonnet und J.L. Rocca, J. Chromatogr. 109, 297 (1975)
- 84) A.E. Smith und K.A. Lord, J. Chromatogr. 107, 407 (1975)
- 85) W.A. Aue, S. Kapila und C.R. Hastings,
J. Chromatogr. 73, 99-104 (1972)
- 86) F. Eisenbeiss und H. Sieper,
J. Chromatogr. 83, 439-446 (1973)
- 87) D. Randau und H. Bayer, J. Chromatogr. 66, 382-385 (1972)
- 88) R.W. Frei, J.F. Lawrence, J. Hope und R.M. Cassidy,
J. Chromatog. Sci. 12, 40 (1974)
- 89) K. Aitzetmüller, J. Chromatogr. 107, 411 (1975)
- 90) J. Pflugmacher und W. Ebing, J. Chromatogr. 109, 199 (1975)
- 91) J.D. Warthen jr., J. Am. Oil Chemists Soc. 52, 151 (1975)
- 92) R.G. Berg, M.A. Ogliaruso und H.M. McNair,
J. Chromatog. Sci. 13, 69 (1975)
- 93) G. Schwedt und H.H. Bussemas,
Chromatographia 9, 17 (1976)
- 94) T. Seki und H. Wada, J. Chromatogr. 114, 227 (1975)
- 95) E.P. Horwitz und C.A.A. Bloomquist,
J. Chromatog. Sci. 12, 200-205 (1974)
- 96) E.P. Horwitz und C.A.A. Bloomquist,
J. Chromatog. Sci. 12, 11 (1974)
- 97) J.M. Hill, J. Chromatogr. 76, 455 (1973)
- 98) H. Meier, E. Zimmerhackl und E. Unger et al.,
Mikrochim. Acta II, 17 (1975)

- 99) J.U. Kaiser, *Chromatographia* 6, 387-389 (1973)
- 100) K.W. Stahl, S. Boos, F.-E. Köster und G. Soldierer, *Z. Anal. Chem.* 259, 219 (1972)
- 101) K.W. Stahl, S. Boos, F.-E. Köster und G. Soldierer, *Z. Anal. Chem.* 261, 354-358 (1972)
- 102) K.W. Stahl, G. Schäfer und W. Lamprecht, *J. Chromatog. Sci.* 10, 95 (1972)
- 103) U. Kramer und K. Bhatia, *J. Chromatogr.* 89, 348-349 (1974)
- 104) M.W. Anders und J.P. Latorre, *J. Chromatog.* 55, 409-413 (1971)
- 105) J.S. Hobbs und J.G. Lawrence, *J. Chromatogr.* 72, 311-318 (1972)
- 106) W. Funasaka, T. Hanai und K. Fujimura, *J. Chromatog. Sci.* 12, 517-520 (1974)
- 107) W. Voelter, Tübinger Seminar 5./6. Nov. 1973 (Abstracts)
- 108) B.D. Nahlovsky und J.H. Lang, *J. Chromatogr.* 101, 225 (1974)
- 109) W. Voelter, H. Bauer und W. Hofmann, *GIT* 18, 444 (1974)
- 110) H. Hyakutake und T. Hanai, *J. Chromatogr.* 108, 385 (1975)
- 111) G. Schomburg und K. Zegarski, *J. Chromatogr.* 114, 174 (1975)
- 112) R.R. Heath, J.H. Tumlinson, R.E. Doolittle und A.T. Proveaux, *J. Chromatog. Sci.* 13, 380 (1975)
- 113) H.-J. Klimisch, *Z. Anal. Chem.* 264, 275-278 (1973)
- 114) H.-J. Klimisch, *J. Chromatogr.* 83, 11-14 (1973)
- 115) M. Martin, J. Lohéac und G. Guiochon, *Chromatographia* 5, 33 (1972)
- 116) S. Ray und R.W. Frei, *J. Chromatogr.* 71, 451-457 (1972)
- 117) R.B. Sleight, *J. Chromatogr.* 83, 31-38 (1973)
- 118) W. Strubert, *Chromatographia* 6, 205 (1973)

- 119) C.G. Vaughan, B.B. Wheals und M.J. Whitehouse,
J. Chromatogr. 78, 203-210 (1973)
- 120) N.F. Yves und L. Giuffrida,
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 55, 757-761 (1972)
- 121) T. Doran und N.G. McTaggart,
J. Chromatog. Sci. 12, 715-721 (1974)
- 122) H.-J. Klimisch, Anal. Chem. 45, 1960-1962 (1973)
- 123) M. Novotny, M.L. Lee und K.D. Bartle,
J. Chromatog. Sci. 12, 606-612 (1974)
- 124) H.-J. Klimisch und D. Ambrosius,
J. Chromatogr. 94, 311 (1974)
- 125) H.-J. Klimisch und D. Ambrosius,
J. Chromatogr. (1976) im Druck
- 126) H.-J. Klimisch und D. Ambrosius,
Z. Anal. Chem. (1976) im Druck
- 127) W.J. Chamberlain, Anal. Chim. Acta 76, 213 (1975)
- 128) W.A. Wildanger, Chromatographia 6, 381-383 (1973)
- 129) F.M. Rabel, Anal. Chem. 45, 957 (1973)
- 130) I. Sebestian, siehe Abb. Titelseite HPLC,
Mai 1976, Machery-Nagel
- 131) W.A. Dark, E.C. Conrad und L.W. Crossman jr.,
J. Chromatogr. 91, 247-260 (1974)
- 132) W.W. McLean, J. Chromatogr. 99, 425 (1974)
- 133) J.G. Lawrence, J. Chromatogr. 84, 299-308 (1973)
- 134) H. Nielsen, J. Chromatogr. 89, 259 (1974)
- 135) M.J. Cooper und M.W. Anders, J. Chromatog.Sci. 13,
407 (1975)
- 136) W. Funasaka, T. Hanai und K. Fujimura,
J. Chromatog. Sci. 12, 517-520 (1974)
- 137) P. Heizmann und K. Ballschmiter, Z. Anal. Chem. 266,
206 (1973)

- 138) W.J. Evans und M.F. Hawthorne,
J. Chromatogr. 88, 187 (1974)
- 139) T.F. Gabriel und J. Michalewsky,
J. Chromatogr. 67, 309-314 (1972)
- 140) T.F. Gabriel und J.E. Michalewsky,
J. Chromatogr. 80, 263-265 (1973)
- 141) R.A. Henry, J.A. Schmit und R.C. Williams,
J. Chromatogr. Sci. 11, 358-365 (1973)
- 142) D.J. Nelson, C.J.L. Bugge, H.C. Krasny und
T.P. Zimmermann, J. Chromatogr. 77, 181-190 (1973)
- 143) E.H. Pfadenhauer, J. Chromatogr. 81, 85-92 (1973)
- 144) J.A. Pickett, J. Chromatogr. 81, 156-159 (1973)
- 145) H.W. Shmukler, J. Chromatogr. Sci. 10, 137 (1972)
- 146) K.W. Stahl, E. Schlimme und G. Schäfer,
J. Chromatogr. 76, 477-481 (1973)
- 147) K.W. Stahl, E. Schlimme und D. Bojanowski,
J. Chromatogr. 83, 395-404 (1973)
- 148) H.-J. Breter, D. Weinblum und R.K. Zahn,
Anal. Biochem. 61, 362-366 (1974)
- 149) N.W.Y. Ho und P.T. Gilham,
Biochim. Biophys. Acta 308, 53-58 (1973)
- 150) R.P. Singhal, Biochim. Biophys. Acta 319, 11-24 (1973)
- 151) R.A. Holton, D.M. Spatz, E.E. van Tamelen und
W. Wierenga, Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 605 (1974)
- 152) K.W. Stahl, E. Schlimme und F. Eckstein,
FEBS Letters 40, 241 (1974)
- 153) J.X. Khym, J. Chromatogr. 97, 277 (1974)
- 154) P.R. Brown, S. Bobick und F.L. Hanley,
J. Chromatogr. 99, 587 (1974)
- 155) H. Komae und N. Hayashi, J. Chromatogr. 114, 258 (1975)

- 156) R.E.W. Scott, S. Zolty und K.K. Chan,
J. Chromatog. Sci. 10, 384 (1972)
- 157) R.E.W. Scott, Ka Kong Chan, P. Kucera und S. Zolty,
J.Chromatog. Sci. 9, 577 (1971)
- 158) W.J.M. van Tilborg, J. Chromatogr. 115, 616 (1975)
- 159) V. Leoni, J. Chromatogr. 62, 63-71 (1971)
- 160) J.N. Seiber, J. Chromatogr. 94, 151-157 (1974)
- 161) H.A. Moye, J. Chromatog. Sci. 13, 268 (1975)
- 162) G.G. Still und E.R. Mansager, Chromatographia 8,
129 (1975)
- 163) R. Stillman und T.S. Ma, Mikrochim. Acta 641, (1974)
- 164) R. De Cleyne und M. Verzele,
Chromatographia 5, 346-350 (1972)
- 165) R.S. Ward und A. Pelter,
J. Chromatog. Sci. 12, 570-574 (1974)
- 166) W. Wildanger, J. Chromatogr. 114, 480 (1975)
- 167) C.V. Manion, D.W. Shoeman und D.L. Azarnoff,
J. Chromatogr. 101, 169 (1974)
- 168) P.P. Rai, T.D. Turner und S.A. Matlin,
J. Chromatogr. 110, 401 (1975)
- 169) A. Rapp, A. Ziegler, O. Bachmann und H. Düring,
Chromatographia 9, 44 (1976)
- 170) F. Bailey und P.N. Brittain,
J. Chromatogr. 83, 431-437 (1973)
- 171) P.J. Cashman, J.I. Thornton und D.L. Shelman,
J. Chromatog. Sci. 11, 7 (1973)
- 172) N.J. Pound, I.J. McGilveray und R.W. Sears,
J. Chromatogr. 89, 23-30 (1974)
- 173) T.L. Sprieck, J. Pharm. Sci. 63, 591 (1974)
- 174) F. Bailey, P.N. Brittain und B.F. Williamson,
J. Chromatogr. 109, 305 (1975)

- 175) M. Caude, Le Xuan Phan, *Chromatographia* 9, 20 (1976)
- 176) Y. Kawano, J. Audino und M. Edlund,
J. Chromatogr. 115, 289 (1975)
- 177) R. Stillman und T.S. Ma, *Mikrochim. Acta* 641, (1974)
- 178) W. Santi, J.M. Huen und R.W. Frei,
J. Chromatogr. 115, 423 (1975)
- 179) W. Wildanger, *Chromatographia* 8, 42 (1975)
- 180) R. Endeke und G. Lettenbauer, J. Chromatogr. 115,
228 (1975)
- 181) A. Pryde und F.J. Dabry, J. Chromatogr. 115, 107 (1975)
- 182) G.G. Skeilern und E.G. Salole, J. Chromatogr. 114,
483 (1975)
- 183) U. Kramer und K. Bhatia, J. Chromatogr. 89,
348-349 (1974)
- 184) R.M. Cassidy, D.S. LeGay und R.W. Frei,
J. Chromatog. Sci. 12, 85 (1974)
- 185) M.D. Grieser und D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.* 45, 1348 (1973)
- 186) A.W. Wolkoff und R.H. Larose, J. Chromatogr. 99, 731 (1974)
- 187) L. Olsson und O. Samuelson, J. Chromatogr. 106, 139 (1975)
- 188) I.D. Watson und M.J. Stewart, J. Chromatogr. 110, 389 (1975)
- 189) K. Kiuchi, T. Ohta und H. Ebine,
J. Chromatog. Sci. 13, 461 (1975)
- 190) A.G. Butterfield, B.A. Lodge und N.J. Pound,
J. Chromatog. Sci. 11, 401 (1973)
- 191) G. Cavina, G. Moretti und A. Cantafora,
J. Chromatogr. 80, 89-100 (1973)
- 192) R.J. Dolphin, J. Chromatogr. 83, 421-429 (1973)
- 193) R.A. Henry, J.A. Schmit und J.F. Dieckman,
J. Chromatog. Sci. 9, 513-520 (1971)

- 194) J.F.K. Huber, J.A.R. Hulsman und C.A.M. Meijers,
J. Chromatogr. 62, 79-91 (1972)
- 195) C.A.M. Meijers, J.A.R. Hulsman und J.F.K. Huber,
Z. Anal. Chem. 259, 218 (1972)
- 196) C.A.M. Meijers, J.A.R. Hulsman und J.F.K. Huber,
Z. Anal. Chem. 261, 347-353 (1972)
- 197) J.C. Touchstone und W. Wortmann,
J. Chromatogr. 76, 244-247 (1973)
- 198) W. Wortmann, C. Schnabel und J.C. Touchstone,
J. Chromatogr. 84, 396-401 (1973)
- 199) H. Rupprecht, G. Kindl und M.J. Biersack,
Pharmazie 29, 207 (1974)
- 200) J.W. Higgins, J. Chromatogr. 115, 232 (1975)
- 201) J.A. Mollica und R.F. Strusz, J. Pharm. Sci. 61, 444 (1972)
- 202) F.A. Fitzpatrick, Clin. Chem. 11, 1293 (1973)
- 203) S.J. van der Wal und J.F.K. Huber,
J. Chromatogr. 102, 353 (1974)
- 204) N.A. Parris, J. Chromatog. Sci. 12, 753 (1974)
- 205) K. Heyns und H. Röper, J. Chromatogr. 93, 429-439 (1974)
- 206) C.D. Scott und N.E. Lee, J. Chromatogr. 83,
383-393 (1973)
- 207) G.G. Still und E.R. Mansager,
Chromatographia 8, 129 (1975)
- 208) H. Hatano, Y. Yamamoto, M. Saito, E. Mochida und
S. Watanabe, J. Chromatogr. 83, 373-380 (1973)
- 209) T. van de Weerdhof, M.L. Wiesrum und H. Reissenweber,
J. Chromatogr. 83, 455-460 (1973)
- 210) M. Vecchi, J. Vesely und G. Oesterhelt,
J. Chromatogr. 83, 447-453 (1973)
- 211) R.G. Williams, D.R. Baker und J.A. Schmit,
J. Chromatog. Sci. 11, 618 (1973)

- 212) R.C. Williams, J.A. Schmit und R.A. Henry,
J. Chromatog. Sci. 10, 494 (1972)
- 213) K. Callmer und L. Davies, Chromatographia 7,
644-650 (1974)
- 214) R. Stillman und T.S. Ma, Mikrochim. Acta 641, (1974)
- 215) H. Steuerle, J. Chromatogr. 115, 447 (1975)
- 216) A.V. Kiselev, S. Nikitin Yu, I. Frolov und I. Yashin Ya,
J. Chromatogr. 91, 187-200 (1974)
- 217) M. Telepchak, J. Chromatographia 6, 234 (1973)
- 218) L.C. Hansen und T.W. Gilbert, J. Chromatog. Sci. 12,
464-472 (1974)
- 219) J.H. Knox und G. Vasvari, J. Chromatog. Sci. 12
449-452 (1974)
- 220) J.M. Telepchak, J. Chromatogr. 83, 125-134 (1973)
- 221) K. Saitoh und N. Suzuki, J. Chromatogr. 111, 29 (1975)
- 222) U. Fehrmann und W. Schnabel, Z. Anal. Chem. 269,
116 (1974)
- 223) M.C. Castle, J. Chromatogr. 115, 437 (1975)
- 224) W. Kochen und F. Trefz, Z. Anal. Chem. 261,
342-347 (1972)
- 225) D.R. Baker, R.A. Henry, R.C. Williams, D.R. Hudson
und N.A. Parris, J. Chromatogr. 83, 233-243 (1973)
- 226) J.J. DeStefano und H.C. Beachell,
J. Chromatog. Sci. 10, 654 (1972)
- 227) E. Godbille und P. Devaux,
J. Chromatog. Sci. 12, 564-569 (1974)
- 228) J.P. Iarmann, R.C. Williams und D.R. Baker,
Chromatographia 8, 92 (1975)
- 229) A. Wehrli, Z. Anal. Chem. 277, 289 (1975)
- 230) A.A. Juhasz, J.O. Doali und J.J. Rocchio,
Internat. Lab. July/Aug. (1974)

- 231) K.J. Bombaugh und P.W. Almquist,
Chromatographia 8, 109 (1975)
- 232) J.A. Attebery, Chromatographia 8, 121 (1975)
- 233) E. Ecker, F. Oppermann und W. Strubert,
GZ-Chem. Techn. 2, 73 (1973)
- 234) K.E. Conroe, Chromatographia 8, 119 (1975)
- 235) T. Inaba und J.F. Brien,
J. Chromatogr. 80, 161-165 (1973)
- 236) T.C. Kram, J. Pharm. Sci. 61, 254-256 (1972)
- 237) J.D. Wittwer Jr. und J.H. Kluckhahn,
J. Chromatog. Sci. 11, 1 (1973)
- 238) M.L. Chan, C. Whetsell und J.D. McChesney,
J. Chromatog. Sci. 12, 512-516 (1974)
- 239) I. Jane und J.F. Taylor, J. Chromatogr. 109, 37 (1975)
- 240) M. Eichelbaum und L. Bertilsson,
J. Chromatogr. 103, 135 (1975)
- 241) E. Murgia, P. Richards und H.F. Walton,
J. Chromatogr. 87, 523 (1973)
- 242) B. Lindström, J. Chromatogr. 100, 189 (1974)
- 243) R.G. Muusze und J.F.K. Huber,
J. Chromatog. Sci. 12, 779 (1974)
- 244) D.H. Rodgers, J. Chromatog. Sci. 12, 742 (1974)
- 245) N.D. Brown, R.T. Lofberg und T.P. Gibson,
J. Chromatogr. 99, 635 (1974)
- 246) J.H. Knox und J. Jurand, J. Chromatogr. 87, 95 (1973)
- 247) J.H. Knox und J. Jurand, J. Chromatogr. 103, 311 (1975)
- 248) M. Riedmann, Chemie-Techn. 3, 393 (1974)
- 249) B.H. Freemann, Proc. Anal. Div. Chem. Soc. 12, 29 (1975)
- 250) H. Endeke, I. Halasz und K. Unger,
J. Chromatogr. 99, 377 (1974)

- 251) R. Endeke, I. Halász und K. Unger,
J. Chromatogr. 99, 377 (1974)
- 252) G.J. Kennedy und J.H. Knox, J. Chromatog. Sci. 10,
549 (1972)
- 253) J.N. Done und J.H. Knox, J. Chromatog. Sci. 10,
606 (1972)
- 254) B.L. Karger und H. Barth, Anal. Letters 4,
595-602 (1971)
- 255) J.F.K. Huber, J. Chromatog. Sci. 7, 85-90 (1969)
- 256) J. Asshauer und I. Halász, J. Chromatog. Sci. 12,
139 (1974)
- 257) R.V. Vivilecchia, R.L. Cotter, R.J. Limpert, N.Z. Thimot
und J.N. Little, J. Chromatogr. 99, 407 (1974)
- 258) I. Halász und P. Walkling, J. Chromatog. Sci. 7,
129-136 (1969)
- 259) R.E. Majors und F.R. MacDonald,
J. Chromatogr. 83, 169-179 (1973)
- 260) R.E. Majors, J. Chromatog. Sci. 11, 88 (1973)
- 261) S. Specht, R.F. Nolte und H.-J. Born,
J. Chromatogr. 110, 239 (1975)
- 262) R.F. Nolte, S. Specht und H.-J. Born,
J. Chromatogr. 110, 253 (1975)
- 263) M. Broquaire, C. Eon und G. Guiochon,
J. Chromatogr. 109, 11 (1975)
- 264) H. Engelhardt, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Springer Verlag
- 265) C.D. Chandler und H.M. McNair,
J. Chromatog.Sci. 11, 468 (1973)
- 266) H.M. McNair und C.D. Chandler,
J. Chromatog. Sci. 12, 425-432 (1974)
- 267) H. Schrenker, CZ-Chem. Techn. 1, 73 (1972)

- 268) T. Wolf, *Chromatographia* 7, 34 (1974)
- 269) W. Wildanger, *LABO* 5, 7 (1974)
- 270) K.J. Bombaugh, R.F. Levangia, R.N. King und
L. Abrahams, *J. Chromatogr. Sci.* 8, 657 (1970)
- 271) H. Lorenz, *GIT* 20, 225 (1976)
- 272) B. Pearce und W. LI. Thomas,
Anal. Chemistry 44, 1107 (1972)
- 273) J. Fleischer, *Chromatographia* 7, 80 (1974)
- 274) P. Jandera und J. Churáček, *J. Chromatogr.* 93, 17 (1974)
- 275) H. Engelhardt und H. Elgass,
J. Chromatogr. 112, 415 (1975)
- 276) P.R. Brown, *J. Chromatog. Sci.* 57, 383-390 (1971)
- 277) R.P.W. Scott und P. Kucera,
J. Chromatogr. 83, 257-266 (1973)
- 278) P. Jandera, M. Janderová und J. Churáček,
J. Chromatogr. 115, 9 (1975)
- 279) M. Krejci und D. Kourilová,
J. Chromatogr. 91, 151-160 (1974)
- 280) J. Polesuk und D.G. Howery,
J. Chromatog. Sci. 11, 226 (1973)
- 281) D.R. Baker, R.C. Williams und J.C. Steichen,
J. Chromatog. Sci. 12, 499-505 (1974)
- 282) R.A. Keller, *J. Chromatog. Sci.* 11, 223 (1973)
- 283) J.E. Wallace, H.E. Hamilton, J.T. Payte und K. Blum,
J. Pharm. Sciences 61, 9, 1397 (1972)
- 284) G. Schomburg, *Z. Anal. Chem.* 277, 275 (1975)
- 285) M.H. Stutz und S. Sass,
Analytical Chemistry 45, 12, 2134 (1973)

- 286) W. Dinges, G. Naundorf und N. Seiler,
J. Chromatog. Sci. 12, 655-657 (1974)
- 287) I. Jane und J.F. Taylor, J. Chromatogr. 109, 37 (1975)
- 288) R.G. Muusze und J.F.K. Huber,
J. Chromatog. Sci. 12, 779 (1974)
- 289) W. Lindner, R.W. Frei und W. Santi,
J. Chromatogr. 111, 365-371 (1975)
- 290) B.G. Julin, H.W. Vandeborn und J.J. Kirkland,
J. Chromatogr. 112, 443 (1975)
- 291) K. Aitzetmüller, J. Chromatog. Sci. 13, 454 (1975)
- 292) B. Fleet und C.J. Little, J. Chromatog. Sci. 12,
747 (1974)
- 293) R.M. Riggin, A.L. Schmidt und P.T. Kissinger,
J. Pharmac. Sci. 64, 4, 680 (1975)
- 294) N. Grubhofer, GIT 17, 688 (1973)
- 295) N. Evans, D.E. Games, A.H. Jackson und S.A. Matlin,
J. Chromatogr. 115, 325 (1975)
- 296) R.E. Lovins, S.R. Ellis, G.D. Tolbert und C.R. Kinney,
Analytical Chemistry 45, 8, 1553 (1973)
- 297) P. Jandera und J. Churacek, J. Chromatogr. 93, 17 (1974)
- 298) L.R. Snyder, J. Chromatog. Sci. 10, 200-212 (1972)
- 299) L.R. Snyder, J. Chromatog. Sci. 10, 369-375 (1972)
- 300) M. Martin, G. Blu, C. Eon und G. Guiochon,
J. Chromatog. Sci. 12, 438-448 (1974)
- 301) H. Engelhardt und N. Weigand,
Anal. Chem. 45, 1149 (1973)
- 302) D.C. Collins und G.F. Freeguard,
Chromatographia 6, 404 (1973)
- 303) I. Halasz und M. Naefe, Anal. Chem. 44, 76-84 (1972)
- 304) L.V. Berry und H. Engelhardt,
J. Chromatogr. 95, 27-38 (1974)

- 305) J.C. Giddings, Anal. Chem. 35, 2215-16 (1963)
- 306) H. Barth, E. Dallmeier, G. Courtois, H.E. Keller
und B.L. Karger, J. Chromatogr. 83, 289-311 (1973)
- 307) L.R. Snyder und M. Dekker,
" Principles of Adsorption Chromatography"
Research Department, Union Oil Company of California,
Brea, California
- 308) H. Ippen "Index Pharmacorum" Thieme Verlag, Stuttgart
- 309) R. Kaiser und G. Gottschalk,
B-J Hochschultaschenbücher, Band 774,
Mannheim, Wien, Zürich
- 310) R.A. Henry und J.A. Schmit, Chromatographia 3,
116 (1970)
- 311) J.A. Mollica, G.R. Padmanabhan und R. Strusz,
Analytical Chemistry 45, 11, 1859 (1973)
- 312) P. Larson, E. Murgia, T.J. Hsu und H.F. Walton,
Analytical Chemistry 45, 14, 2306 (1973)
- 313) Du Pont, Chromatographic Methods Nov. 1 (1969)
- 314) M.W. Anders und J.P. Lattore,
J. Chromatogr. 55, 409 (1971)
- 315) M.W. Anders und J.P. Lattore,
Analytical Chemistry 42, 12, 1430 (1970)
- 316) H.F. Walton, J. Chromatogr. 102, 57 (1974)
- 317) R.L. Stevenson und C.A. Burtis,
J. Chromatogr. 61, 253 (1971)
- 318) R.W. Roos, J. Pharmac. Science 61, 12, 1979 (1972)
- 319) E. Murgia, P. Richards und H.F. Walton,
J. Chromatogr. 87, 523 (1973)
- 320) J.S. Mayell, C.F. Hiskey und L. Lachmann,
Analytical Chemistry 46, 3, 449 (1974)

- 321) J.N. Knox und J. Jurand, J. Chromatogr. 82,
398 (1973)
- 322) C.M. Hernandez und H.F. Walton,
Analytical Chemistry 44, 6, 890 (1972)
- 323) E. Merck, Flüssigchromatographie unter Druck
Anwendungsbeispiel 8 (1973)
- 324) S. Ebel und G. Herold,
unveröffentlichte Ergebnisse

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren:

Böhme, Cherdron, Dehnicke, Dimroth, Ebel, Eger, Haake, Hartke,
Heitz, Kating, Krieglstein, List, Nultsch, Otto, Ruland,
Schiff, Schmitz, Seitz, Unterhalt, Walcher, Willuhn.

Lebenslauf

1.2.1950	Geboren in Isernhagen bei Hannover als erstes Kind des Offiziers im Bundesgrenzschutz Konrad Tank und seiner Ehefrau Lieselotte Tank, geb. Lewin
1954	Geburt meines Bruders Michael am 11.4.1954 Umzug nach Lübeck
1956 - 60	Besuch der Volksschule in Lübeck
1960 - 68	Besuch des math.-naturw. Zweiges des Johanneums, Gymnasium für Jungen, in Lübeck
Juni 1968	Reifeprüfung
1.8.1968 - 31.7.1969	Praktikantenzeit in der Krankenhausapotheke der Medizinischen Akademie zu Lübeck
1.8.1969-31.7.1970	Praktikantenzeit in der Markt-Apotheke Bad Schwartau
Juli 1970	Vorexamen
Okt.1970-73	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
Okt.1972-Febr.1974	Studentischer Tutor an der Philipps-Universität Marburg
Okt.1973	Staatsexamen
Okt.1973-Juli 1976	Lehrauftrag der Kaufmännischen Berufsschule Marburg für den Fachkundeunterricht der Apothekenhelferinnen
Okt.1973-Febr.1974	Fortgeschrittenenpraktikum am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg
1.3.1974-28.2.1976	wissenschaftliche Hilfskraft an der Philipps-Universität Marburg
seit 1.2.1974	Arbeit an einer Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. S. Ebel
15.3.1974	Vermählung mit der Apothekerin Anneliese Krause
seit 1.3.1976	wissenschaftlicher Angestellter an der Philipps-Universität Marburg

